

На правах рукописи

**КОТОВ Николай Викторович**

**ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ *PARAMECIUM CAUDATUM***

03 00 02 - Биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора физико-математических наук

Пущино - 2001

Работа выполнена в Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина

Официальные оппоненты:

Доктор физико-математических наук, профессор Г. Ю. Ризниченко

Доктор физико-математических наук В.В. Смолянинов

Доктор физико-математических наук В.Н. Казаченко

Ведущее учреждение – Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН.

Защита состоится “ 5 ” декабря 2001 г. в “ 15<sup>30</sup> ” часов на заседании специализированного совета Д 002.093.01 при Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН по адресу: 142290, г. Пущино, Московская область, ул. Институтская, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института.

Автореферат разослан “ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2001 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат физико-математических наук

Н.Ф. Ланина.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** По современным представлениям двигательная активность *Paramecium caudatum* обусловлена функционированием сложной биомолекулярной системы, осуществляющей управление эффекторными элементами клетки. В эту систему включены потенциалы и лигандзависимые ионные каналы, кальций, циклические нуклеотиды, протеинкиназы и т.п. Подобного рода системы входят в очень многие клетки животных и человека, управляя различными типами их активности. В зависимости от ситуации во внешней среде и собственного состояния в клетке разворачивается тот или иной тип активности.

Несмотря на большой экспериментальный материал, полученный при исследовании молекулярных систем, управляющих двигательной активностью парameций, общего понимания принципов их работы до последнего времени не было. Всестороннее экспериментальное исследование систем, управляющих клеточной активностью, и разработка математических моделей позволила нам продвинуться в понимании принципов функционирования системы, управляющей двигательной активностью *Paramecium caudatum*. Поскольку эта система имеет много общего с системами, управляющими активностью самых различных клеток эукариот, наши исследования имеют большое значение для понимания механизмов функционирования систем, управляющих активностью клеток эукариот.

**Цель и основные задачи исследования.** Цель работы заключалась в выяснении механизмов, управляющих двигательной активностью парameций. В связи с этим были поставлены и решены следующие задачи.

Проведено исследование феноменологии различных типов двигательной активности *Paramecium caudatum*: реакции избегания, реакции оборонительного ускорения, двигательной активности на начальных этапах конъюгации, движения в условиях ограниченного пространства, динамического удержания в заданной области пространства, движения парameций во внешнем электрическом поле.

Исследованы свойства электровозбудимой мембраны *Paramecium caudatum*. На основе собственных результатов и результатов, полученных в различных лабораториях, построена общая схема системы, управляющей двигательной активностью парameций.

Построены математические модели различных блоков, входящих в систему управляющую двигательной активностью парameций: блока, управляющего концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  в ресничках, кальций-кальмодулинового блока, блока циклических нуклеотидов, протеинкиназного блока.

Построена математическая модель, связывающая частоту и направление эффективного удара ресничек с характеристиками спиральной траектории движения парameций (радиусом, шагом, проекцией вектора скорости на ось спиральной траектории)

Проанализирована работа систем, управляющих эффекторами парameций при выполнении следующих реакций: реакции избегания, реакции оборонительного ускорения, движения парameций во внешнем электрическом поле, динамического удержания в заданной области, реакции разворота.

**Научная новизна.** Впервые проведено количественное описание феноменологии двигательной активности парameций при выполнении следующих реакций: реакции избегания, реакции оборонительного ускорения. Впервые проведено исследование реакции динамического удержания в заданной области пространства, на начальных этапах конъюгации, движения в условиях ограниченного пространства.

Построены новые математические модели следующих молекулярных модулей: модуля, формирующего концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в ресничках, кальций кальмодулин зависимых элементов клетки, блока циклических нуклеотидов, протеинкиназного блока.

Впервые построена математическая модель, связывающая частоту и направление эффективного удара ресничек с радиусом, шагом и проекцией вектора скорости на ось спиральной траектории.

Впервые построена модель биомолекулярной системы, управляющей ресничным двигателем парameций при выполнении реакции избегания, реакции оборонительного ускорения, динамического удержания в заданной области пространства, движения парameций во внешнем электрическом поле.

**Научно-практическая ценность.** Результаты исследований дают новые представления о механизмах работы систем, управляющих активностью клеток эукариот. Это позволяет по-новому взглянуть на функции различных элементов молекулярных систем управления в живом и принципов построения таких систем. Результаты исследований могут быть использованы при разработке новых средств диагностики молекулярных патологий и способов их корректировки. Полученные результаты могут представлять интерес не только для биофизиков, но и для исследователей в смежных областях молекулярной биологии и физики.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были доложены на Всесоюзной конференции “Молекулярные механизмы проницаемости мембранных структур” (Паланга, 1976), на II, III, IV совещаниях по “Немышечные формы подвижности” (Пушино, 1978, 1981, Чернигов, 1984), на Российских научных конференциях “Математические модели нелинейных возбуждений, переноса, динамики, управления в конденсированных системах и других средах” (Тверь, 1994), “Структура и динамика молекулярных систем” (Яльчик, 1996, 1997, 1998, 2000, 2001), на летней международной школе по биофизике (Rovinj, Croatia, 1997), “Актуальные проблемы нейробиологии” (Казань, 1998, 1999, 2000), “Проблемы теоретической биофизики”. (Москва, 1998), “Физика в биологии и медицине” (Екатеринбург, 1999), на II съезде биофизиков России

(Москва, 1999), на "Четвертой международной конференции по математическому моделированию" (Москва, 2000), на школе конференции "Горизонты физико-химической биологии" (Пущино, 2000), на XVIII съезде физиологического общества имени И.П. Павлова (Казань, 2001).

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 256 с., содержит 118 рис., 10 таблиц и состоит из введения, описания использованных в работе материалов и методов исследования, изложения собственных экспериментальных данных, изложения разработанных нами математических моделей, обсуждения результатов работы и выводов. Список цитированной литературы содержит 361 наименование.

### **Введение**

Двигательная активность клеток исследуется очень давно. В той или иной мере она может быть отождествлена с поведением клеток. Хотя к поведенческим реакциям, безусловно, относятся не только двигательное поведение клеток. В этом смысле двигательная активность клеток является частью активности клеток, которую можно отождествлять с поведением клеток.

Каковы же механизмы, обеспечивающие все многообразие форм поведения клеток эукариот? Гофер (Hofer, 1890), предположил, что системой, формирующей поведение клеток, является ее ядро. Несомненно, ядро, как основной хранитель наследственной информации, выполняет определенную функцию в формировании поведения клеток эукариот, но ядро в принципе не может обеспечивать управление быстрыми поведенческими реакциями длящимися секунды или доли секунд. Нерисгеймер и Шарп (Neresheimer, 1903, Sharp, 1914), основываясь на чисто внешнем сходстве сети фибрилл, которые им удалось обнаружить в теле простейших, с нервной системой многоклеточных, предположили, что именно эта сеть выполняет функцию управления поведением клеток эукариот. Аронет (1977) высказал гипотезу, что "нервной" и "гуморальной" системой клеток сразу может быть эндоплазматический ретикулум. Либерман (1972, 1973, 1974а, 1974б, 1974в) высказал гипотезу о молекулярной вычислительной машине клетки. Он предположил, что живой клеткой управляет параллельно последовательная стохастическая молекулярная вычислительная машина, которая может быть эквивалентна универсальной вычислительной машине.

"Основные экспериментальные факты, накопленные к настоящему времени, позволяют считать простейших относительно слабо интегрированными животными. Их поведение обеспечивается целым рядом относительно независимых разнохарактерных полуавтономных клеточных систем, общий контроль за деятельностью которых прямо или косвенно осуществляется ядерными сигналами" пишет Серавин (Серавин, Орловская, 1977).

Можно полагать, что общие принципы работы механизмов, формирующих поведение

клеток эукариот одинаковы как для простейших, так и для клеток многоклеточных. Несмотря на различия в морфологии клеток многоклеточных и простейших, необходимо отметить множество гомологий, общих принципов построения различного рода клеточных систем. Имея общего предка и те, и другие формировались на базе тех эволюционных “достижений”, которые были в наличии к тому времени. Как выясняется сейчас, у этого общего предка было сформировано уже большое количество молекулярных систем, управляющих его активностью.

Нами в качестве объекта исследований были выбраны инфузории нескольких родов, Основная же работа проводилась с парамециями (*Paramecium caudatum*). Мы исследовали механизмы формирования поведенческих реакций, обусловленных двигательной активностью инфузорий. Поэтому сам термин поведение в работе используется очень мало, речь идет о двигательной активности, которая является, безусловно, одной из сторон поведения клеток эукариот.

Различные типы двигательной активности инфузорий, по сути, являются элементами системы, обеспечивающей выживание и прогрессивное развитие вида. Описано несколько типов двигательной активности парамеций (Jennings, 1907, Серавин, 1967, Kuznicki, 1970). В различных лабораториях мира проводится изучение физико-химических механизмов, лежащих в основе различных типов двигательной активности парамеций (Naitoh, 1974, Machemer, Peyer, 1977, Eckert, 1979, Hennessey et al. 1995, Preston et al., 1997, 1998, 1999). В ранних работах (Kamada, 1934; Kinosita et al., 1964a; Naitoh, 1958, 1964b; Kinosita, Murakami, 1967; Dryl, 1966; Кокина, 1965) было показано, что при изменении разности потенциалов на мембране простейшего изменяется характер биения ресничек. Эккерт (1972) подытожив все, полученное ранее, сформулировал основные гипотезы относительно механизма управления биением ресничек инфузорий: реверсия и увеличение частоты биения ресничек обусловлены увеличением в них концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  происходит при генерации  $\text{Ca}^{2+}$  спайка. Эта гипотеза получила подтверждение в дальнейших исследованиях (Naitoh, Koneko, 1972; Naitoh, 1973; Machemer, Eckert, 1973; Machemer, 1974; Eckert, 1979; Hage et al., 1984; Hennessey et al., 1984). Однако, в рамках этой гипотезы не затрагиваются многие стороны механизма управления биением ресничек. Остается непонятно, как управляется кальциевый канал - каково участие в этом управлении трансмембранной разности потенциалов и самого кальция, какой вклад в формирование изменение концентрации кальция в ресничках вносит ток кальция из реснички в тело клетки. У парамеций также выявлены различные цитоплазматические фракции, принимающие участие в функционировании возбудимости (Hage, Hiwatashi, 1982; Hage et al., 1982; Nick et al., 1982).

Исследования, проведенные в различных лабораториях показывают, что в механизм управления биением ресничек входит также большая группа белков (Browning, Nelson, 1976;

Andrews, Nelson, 1979; Adout et al., 1980; Adoutte et al., 1981; Firté et al., 1981; Merkle et al., 1981; Ramanathan et al., 1981; Haynes et al., 1998; Mimikakis et al., 1998). Остается непонятным в механизм каких функций входят эти белки.

Двигатель инфузорий состоит из громадного числа ресничек, совершающих колебательные движения. Единственный параметр, который может объединять их работу, это разность потенциалов на цитоплазматической мембране. Сенсорные элементы клетки, которые вызывают изменения трансмембранной разности потенциалов, запускают синхронные изменения в работе ресничек. Однако, очень сложно увидеть прямую связь работы потенциалозависимых элементов, возбудимой мембраны и цитоплазматических белков с поведением клеток.

В своей работе мы как-то стремились восполнить этот пробел, видя главную цель в изучении механизмов формирования двигательной активности парameций.

### **Материал и методика исследований**

Основным материалом в нашей работе был вид *Paramecium caudatum*. Кроме того, для сравнительного анализа и проверки некоторых общих положений использовались *Spirostomum ambiguum*, *Paramecium aurelia*, *Paramecium bursaria*, *Dileptus anser*, *Lacrimaria olor*, *Stentor coeruleus*, *Climacostomum virens*.

### **Установка для исследования двигательной активности простейших**

Фиксация движения простейших проводилась в трех вариантах: покадровая съемка, стробоскопическая съемка на пленку и покадровая съемка в память компьютера. При стробоскопической съемке использовалась два источника света - импульсный с длительностью вспышки менее 1 мс и лампа накаливания.

### **Микроэлектродная установка**

Электрофизиологические исследования проводили с помощью микроэлектродной установки, которая во многом повторяла установку, разработанную в институте Биофизики АН СССР, для исследования изолированного нейрона (Крастс, 1975а). Блоки измерения потенциала и тока были собраны по схемам, разработанным в СКБ Биофизприбор (Максимов и др., 1975а; Максимов и др., 1975б).

### **Феноменология двигательной активности *Paramecium caudatum***

Для решения двигательных задач у *Paramecium* эволюционно сформировался определенный набор эффекторов, сенсорное обеспечение, управляющие системы, которая на основе сигналов, поступающих из внешнего мира, и с учетом собственного состояния реализует тот или иной тип поведения, который, по сути, входит в механизм реализации базовых процессов. От качества реализации этих процессов в конечном итоге зависит выживаемость

вида.

Анализируя двигательную активность парameций, сейчас можно сказать, что механизм реализации двигательных функций (рис. 1) построен на базе стандартных двигательных реакций (программ). Одна и та же двигательная программа может входить в механизм реализации нескольких функций. Например, реакция избегания используется при поиске полового партнера, при стыковке парameций комплементарными зонами,



Рис. 1. Функциональная схема двигательной активности *Paramecium*.

при преодолении механических преград, при защите от хищника, атакующего спереди. Выстрел трихоцист используется парameциями при защите от хищников и при остановке клеток. Управляя двигателем, *P. caudatum* способна решать целый класс возникающие перед ней двигательных задач. Кроме того, *P. caudatum* обладает еще целым рядом эффекторов, расширяющих ее приспособительные возможности и повышающих ее выживаемость. Это системы: 1) обратимо изменяющая форму тела клетки, 2) выстреливающая трихоцисты, 3) изменяющая липкость клеток друг к другу.

Из предварительного анализа двигательной активности *P. caudatum* можно видеть, что различные двигательные задачи клеткой **решаются на основе стандартного набора двигательных реакций**. Эти двигательные реакции формируются поступающими на эффекторы сигналами, которые вырабатывает управляющая система. Целевая функция этой



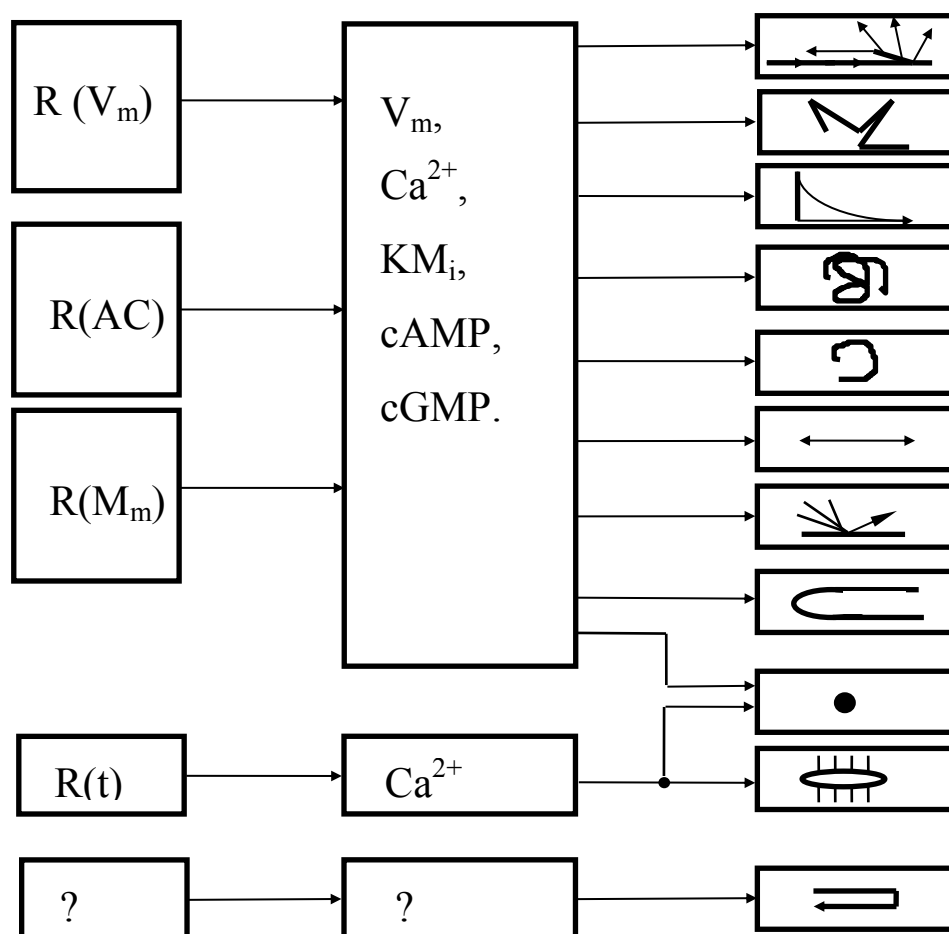


Рис. 2. Основные двигательные программы *Paramecium caudatum*.

системы - выработать адекватное ситуации поведение клетки. Кроме того, работа системы, управляющей поведением клетки, должна удовлетворять определенным критериям качества управления. При запуске реакции избегания скорость движения клетки должна изменить знак на противоположенный за минимально возможный промежуток времени. Стыковка клеток при конъюгации должна проходить за временной интервал меньшей жизненного цикла клетки.

Базовый же процесс управления движением, по мнению Н.А. Бернштейна (Бернштейн, 1926), направлен на преодоление избыточных степеней свободы. Сейчас можно полагать, что у простейших преодоление избыточных степеней свободы основано на ситуативном включении стандартных двигательных программ, параметры которых могут перестраиваться в соответствии с изменениями во внешней среде и собственными состояниями.

### Основные двигательные программы *Paramecium caudatum*

Основные двигательные программы *P. caudatum* можно представить следующей схемой (рис. 2): На этой схеме собраны вместе все выделенные нами двигательные реакции *P. caudatum*. Нам удалось выделить одиннадцать двигательных реакций, обеспеченных

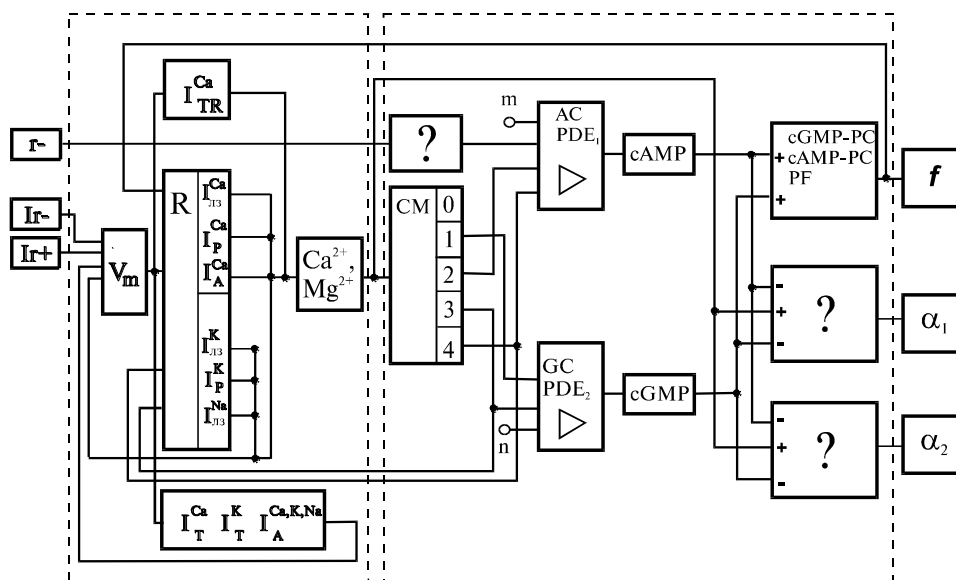


Рис. 3. Принципиальная схема молекулярной системы, управляющей ресничками.  $V_m$  – транс-мембранная разность потенциалов,  $I_i^{Ca}$ ,  $I_i^K$  – кальциевые и калиевые токи в мембране реснички,  $I_{TR}^{Ca}$  – кальциевый ток из реснички в тело клетки,  $I_T^i$  – токи в мембране тела клетки, CM – кальмодулин, AC – аденилатциклаза, GC – гуанилатциклаза, PDE – фосфодиэстеразы, PC – протеинкиназа, PF – фосфопроteinфосфатаза,  $f$  – частота биения ресничек,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  – направления эффективного удара ресничек.

определенными двигательными программами. Кроме того, на этой схеме обозначены модули, которые формируют данные типы двигательной активности парameций. Это обозначение фиксирует вторичные посредники, с помощью которых реализуется механизм этих реакций. На основе экспериментальных данных, полученными в различных лабораториях, систему, управляющую ресничками можно представить в виде следующей схемы (рис. 3).

Анализируя эту схему сейчас можно выделить несколько модулей, которые можно анализировать по отдельности 1) модуль определяющий концентрацию кальция в ресничках, 2) кальций кальмодулиновый модуль, 3) модули, определяющие концентрацию циклических монофосфатов в ресничках, 4) модули, обеспечивающие фосфорилирование эффекторных белков денеиновых ручек. Эти модули нами были рассмотрены по отдельности.

Особое место в этой системе занимает кальмодулин, белок с четырьмя центрами связывания  $Ca^{2+}$ . Этот белок модулирует проводимость каналов, аденилатциклазы, гуанилатциклазы, фосфодиэстераз.

### **Моделирование реакции комплексообразования вещества, имеющего $n$ центров связывания, с лигандами**

Для того, чтобы проводить анализ свойств молекул с несколькими центрами связывания лиганда, рассмотрим динамику и статику реакции комплексообразования произвольного белка (M), имеющего  $n$  центров связывания, с молекулами трех сортов (U), (N) и (V). Рассмотрим случай, когда кооперативности между центрами связывания нет. Будем полагать, что молекулы U и N, образуя комплекс с M, приводят аналогичным конформационным перестройкам M. Константы реакций комплексообразования U и N с M разные. Пусть образование комплекса M

с V приводят к совершенно иным конформационным изменениям M. Молекулы V будут конкурировать с U и N за места связывания на M. В результате реакции M с U, N, V будет образовываться  $4^n$  молекулярных форм M в зависимости от того, сколько молекул U, N и V связано с белком M и, какие конкретно центры связывания в белке M заняты этими молекулами. Поскольку образование комплексов M с U и N приводит к аналогичным конформационным изменениям M различимых форм будет меньше -  $3^n$ . Обозначим эти конформационно различимые молекулярные формы M с U, N, V через  $H(i)$ ,  $i = 0, 1, \dots, (3^n - 1)$ . В общем случае константы скоростей ассоциации реакции комплексообразования U, N, V с M будут нелинейными функциями от концентрации U, N, V. При  $\tau = 0$  положим  $[U] = [U]_1$ ,  $H(i) = H(i)_1$ . Пусть также определена быстрая буферная система, задающая зависимость концентрации [U] от времени  $-f(\tau)$ , а  $[N] = \text{const}$ ,  $[V] = \text{const}$ .

Введем безразмерные величины  $h_i = [H(i)]/[H_0]$ ,  $u = [U]/\max(K_j)$ ,  $n = [N]/\max(P_j)$ ,  $v = [V]/\max(W_j)$ ,  $K_j = k_{-1}^j / k_1^j$ ,  $P_j = n_{-1}^j / n_1^j$ ,  $W_j = v_{-1}^j / v_1^j$ ,  $\tau = t \cdot \max(k_{-1}^j)$ ,  $k_j = K_j / \max(K_j)$ ,  $p_j = P_j / \max(P_j)$ ,  $w_j = W_j / \max(W_j)$ ,  $\mu_j = k_{-1}^j / \max(k_{-1}^j)$ ,  $\delta_j = n_{-1}^j / \max(k_{-1}^j)$ ,  $\gamma_j = v_{-1}^j / \max(k_{-1}^j)$ , ( $j = 1, 2, \dots, n$ ).  $[H_0]$  - общая концентрация M. Пусть

$$f(\tau) = \begin{cases} u_1 & \text{при } \tau = 0 \\ u_2 & \text{при } \tau > 0 \end{cases}$$

При  $\tau = 0$  положим  $h_i(\tau, u) = h_i(0, u_1)$ ,  $i = 0, 1, \dots, (3^n - 1)$ .

Запишем систему дифференциальных уравнений для  $h_i$  в матричной форме:

$$h' = A \cdot h. \quad (1)$$

Поскольку предполагается, что кооперативности между центрами связывания нет, то связывание молекул U, N, V с центрами связывания на M будет происходить независимым образом. Решения системы уравнений (1) можно записать как произведения решений для отдельных центров связывания. Введем обозначения:

$$\begin{aligned} \varphi_j(u) &= \left( \frac{u}{k_j} + \frac{n}{p_j} + \frac{v}{w_j} + 1 \right), \\ \psi_j(u) &= \left( \frac{u}{k_j} + \frac{n}{p_j} + \frac{v}{w_j} \cdot \gamma_j + \gamma_j + 1 \right), \\ \lambda_{1j} &= -0.5 \cdot \left( \psi_j(u_2) - \sqrt{\left( \psi_j(u_2) \right)^2 - 4 \cdot \gamma_j \cdot \varphi_j(u_2)} \right), \\ \lambda_{2j} &= -0.5 \cdot \left( \psi_j(u_2) + \sqrt{\left( \psi_j(u_2) \right)^2 - 4 \cdot \gamma_j \cdot \varphi_j(u_2)} \right), \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
D_{0j} &= \frac{1}{\varphi_j(u_2)} \cdot \left[ 1 + \left[ \frac{u_2 - u_1}{k_j \cdot \varphi_j(u_1)} \cdot \left( \frac{\gamma_j + \lambda_{1j}}{\gamma_j \cdot (\lambda_{2j} - \lambda_{1j})} \cdot \exp(\lambda_{1j} \cdot \mu_j \cdot \tau) - \frac{\gamma_j + \lambda_{2j}}{\gamma_j \cdot (\lambda_{2j} - \lambda_{1j})} \cdot \exp(\lambda_{2j} \cdot \mu_j \cdot \tau) \right) \right] \right], \quad (2) \\
D_{1j} &= \frac{u_2/k_j + n/p_j}{\varphi_j(u_2)} \cdot \left[ 1 + \left[ \frac{u_2 - u_1}{k_j \cdot \varphi_j(u_1)} \cdot \left( \frac{\gamma_j + \lambda_{1j}}{\gamma_j \cdot (\lambda_{2j} - \lambda_{1j}) \cdot (1 + \lambda_{1j})} \cdot \exp(\lambda_{1j} \cdot \mu_j \cdot \tau) - \frac{\gamma_j + \lambda_{2j}}{\gamma_j \cdot (\lambda_{2j} - \lambda_{1j}) \cdot (1 + \lambda_{2j})} \cdot \exp(\lambda_{2j} \cdot \mu_j \cdot \tau) \right) \right] \right], \\
D_{2j} &= \frac{v/w_j}{\varphi_j(u_2)} \cdot \left[ 1 + \left[ \frac{(u_2 - u_1)}{k_j \cdot \varphi_j(u_1)} \cdot \left( \frac{\lambda_{2j}}{\lambda_{2j} - \lambda_{1j}} \cdot \exp(\lambda_{1j} \cdot \mu_j \cdot \tau) - \frac{\lambda_{1j}}{\lambda_{2j} - \lambda_{1j}} \cdot \exp(\lambda_{2j} \cdot \mu_j \cdot \tau) \right) \right] \right], \\
L_{0j} &= \frac{1}{\varphi_j(u)}, \\
L_{1j} &= \frac{1}{\varphi_j(u)} \cdot \left[ \frac{u}{k_j} + \frac{n}{p_j} \right], \\
L_{2j} &= \frac{1}{\varphi_j(u)} \cdot \frac{v}{w_j}.
\end{aligned}$$

По сути,  $D_{0j}, D_{1j}, D_{2j}$  это вероятности того, что  $j$  центр свободен, что  $j$  центр занят молекулами U или N, что  $j$  центр занят молекулой V соответственно. Тогда используя (2), можно записать выражения для концентрации молекулярных форм  $h_i$  в следующем виде:

$$\begin{aligned}
h_i(u, \tau) &= \prod_{j=1}^n D_{f_{ij}}, \\
h_i(u) &= \prod_{j=1}^n L_{f_{ij}},
\end{aligned} \quad (3)$$

Выражения для стационарной концентрации обозначены  $h_i(u)$ . Все  $3^n$  выражений являются всевозможными произведениями  $n$  элементов, принимающих значения  $D_{0j}, D_{1j}, D_{2j}$  и  $L_{0j}, L_{1j}, L_{2j}$  ( $j = 1, 2, \dots, n$ ). В каждом конкретном случае связь между  $i$  и значениями  $f_j$  можно задавать перечислением.

### Моделирование динамики и статики молекулярных форм кальмодулина

Организация поведения парамеций происходит за счет пространственно временной координации активности эффекторных белков, ферментов, ионных каналов. Особую роль в этой координации играют ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , которые влияют на процессы, происходящие в клетке через кальций связывающие белки. Одним из таких белков является кальмодулин (КМ) (Орлов, 1987; Пермяков, 1985, 1993; Bonini et al., 1987; Evans et al., 1989). Через этот белок ионами  $\text{Ca}^{2+}$  модулируется активность различных элементов клетки. Предполагается, что по мере связывания  $\text{Ca}^{2+}$  КМ изменяет свою конформацию, переходя из одной молекулярной формы в другую, различные же молекулярные формы КМ активируют определенные белки (Орлов, 1987; Пермяков, 1985). Допустим, что общая концентрация кальмодулина  $[\text{KM}0]$  намного больше общей концентрации R -  $[\text{R}0]$ , белка, активность которого модулируется КМ. Тогда

изменения во времени концентрации физиологически значимых молекулярных форм  $KM_i$  от концентрации  $Ca^{2+}$  при  $u = f(\tau)$  и стационарная зависимость (при  $n = \text{const}$ ,  $v = \text{const}$ ) будут:

$$\begin{aligned} [KM_i(u, \tau_1)] &= [KM0] \cdot m_i^4(u, \tau_1), \\ [KM_i(u)] &= [KM0] \cdot m_i^4(u), \end{aligned} \quad (4)$$

где  $u = [Ca^{2+}]/\max(K_j)$ ,  $\tau_1 = t \cdot \max(k_{-1}^j)$ ;  $K_j$ ,  $k_{-1}^j$  ( $j = 1, 2, \dots, 4$ ) равновесные константы диссоциации и константы скоростей диссоциации реакции  $Ca^{2+}$  с КМ,

$$\begin{aligned} m_i^4(u, \tau) &= \prod_{j=1}^4 D_{f,j}, \\ m_i^4(u) &= \prod_{j=1}^4 L_{f,j}. \end{aligned}$$

На рис. 4а,б приведены теоретические графики зависимости концентрации  $km_i = [Km_i]/[KM0]$  от времени при импульсном скачке концентрации  $Ca^{2+}$  от малых значений

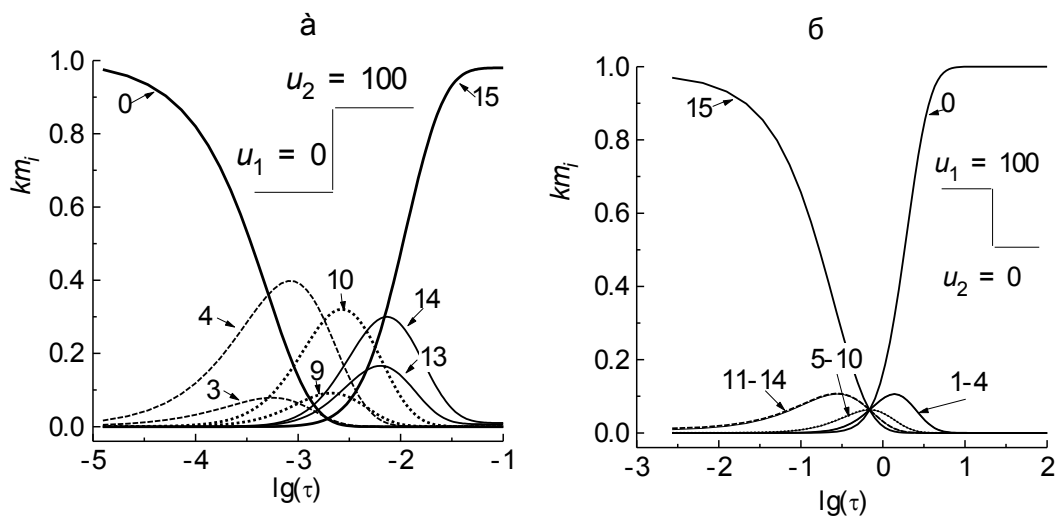


Рис. 4. Динамика изменения концентрации  $km_i$  при импульсном скачке концентрации  $Ca^{2+}$ .  $n = 0$ ,  $v = 0$ ,  $\tau = t \cdot \max(k_{-1}^j)$ .

к большим и от больших к малым  $u = f(\tau)$  а)  $u_1 = 0$ ,  $u_2 = 100$ , б)  $u_1 = 100$ ,  $u_2 = 0$ . На рис. 5 приведены теоретические графики стационарной зависимости концентрации  $km_i$  от концентрации  $Ca^{2+}$ . И в первом и во втором случае концентрации 14 молекулярных форм ( $km_1$ - $km_{14}$ ) изменяются однотипно. Форма этой зависимости имеет колоколообразный вид, который может быть охарактеризован амплитудой  $\max(km_i)$  и значениями времени (на кинетических кривых), концентрации  $Ca^{2+}$  (на стационарных кривых), при которых достигаются максимальные значения концентрации  $km_i$ . значения концентрации  $km_i$ . На рис. 6 представлены зависимости положений точек максимума и полумаксимальных значений мод кальмодулина от концентрации V ( $Mg^{2+}$ ).

### Активность аденилатциклаз

Нами была рассмотрена зависимость активности аденилатциклазы (АТФ-пирофосфатлиаза) (АС) от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . У

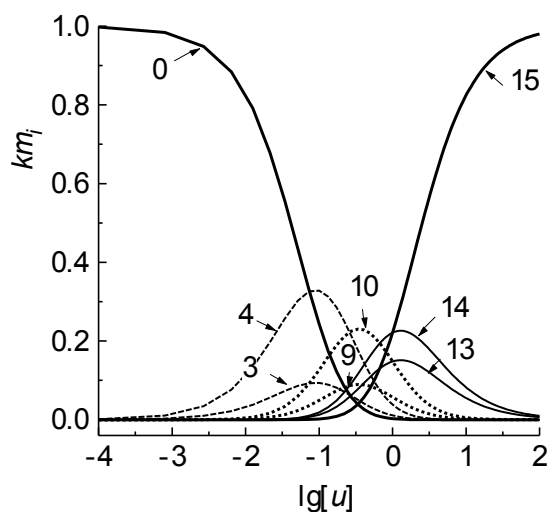


Рис. 5. Зависимость стационарной концентрации  $km_i$  от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ .  $v = 0$ ,  $n = 0$ .

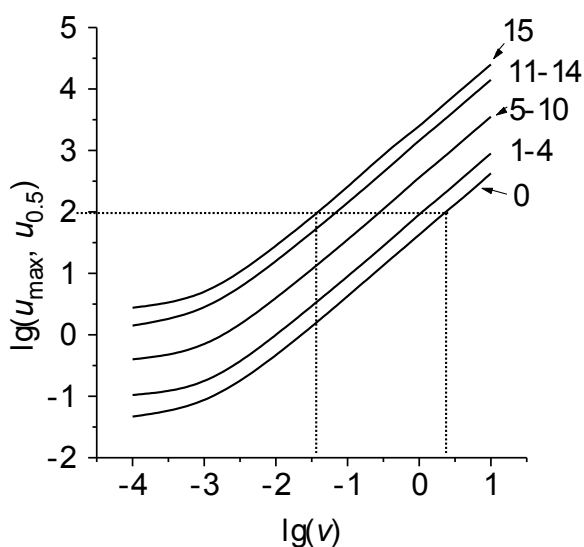


Рис. 6. Зависимость положения точек максимальной концентрации  $km_{1-14} - u_{\max}$  и точек полумаксимального значения концентрации  $km_0, km_{15} - u_{0.5}$  от концентрации  $V (\text{Mg}^{2+})$ .

парамиций этот фермент активируется  $\text{Ca}^{2+}$  через КМ. Сегодня описано 3 различных АС (Gustin et al., 1987; Mons et al., 1994; Watson et al., 1994; Choi et al., 1992; Wu et al., 1993) с разными зависимостями активности этих АС от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Нами получено выражение, описывающее зависимость активности АС от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ :

$$[\text{AC}^*(u, \tau_2)] = [\text{AC0}] \cdot m_1^1(h, \tau_2) \cdot m_1^4(u)$$

Используя это выражение, мы получили формулы для зависимости активности АС парамеций от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . На рис. 7 представлены экспериментальные результаты и теоретические кривые зависимости активности АС из мозга быка и парамеций.

Аналогичным образом были получены зависимости активности GC от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . На рис. 8 представлены экспериментальные результаты и теоретическая кривая зависимости активности GC от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ .

### Метаболизм циклических монофосфатов. Метаболизм сАМР

Циклический аденозинмонофосфат (сАМР) участвует в регуляции клеточной активности (Sutherland et al., 1965; Ivashkin et al., 1987). Нами получены выражения для стационарной

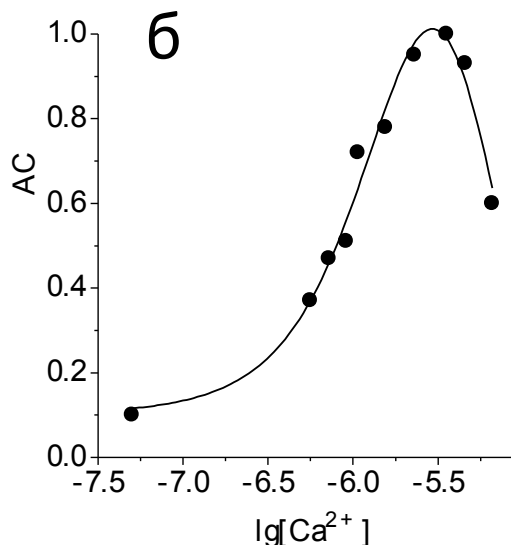
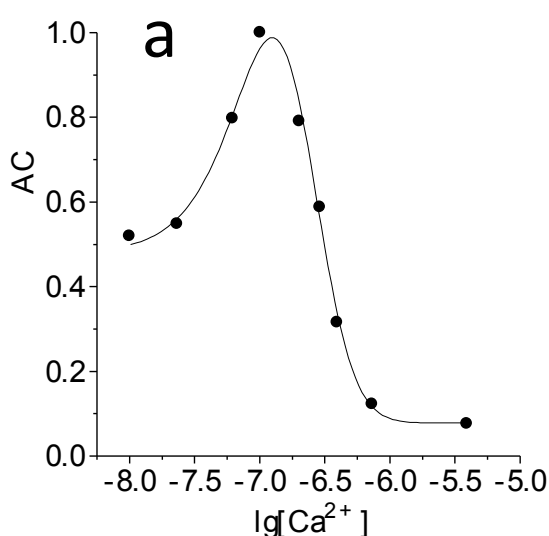


Рис. 7. Зависимость активности АС из мозга быка (а) и парамеций (б) от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Точки - экспериментальные результаты Ткачук (Орлов, 1987; Gustin et al., 1987), сплошная линия теоретическая кривая.

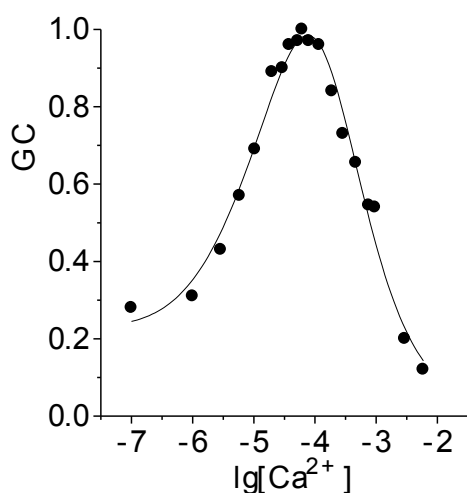


Рис. 8. Зависимость активности GC парамеций от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Точки - экспериментальные результаты (Gustin et al., 1987) сплошная линия - теоретическая кривая.

зависимости и динамики концентрации сАМР при изменении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ .

Метаболизм сАМР определяется активностью аденилатциклазы (EC 4.6.1.1, ATP pyrophosphat-lyase-cyclizing-AC (АТФ-пирофосфатлиазы) (АС) и фосфодиэстеразы (3':5'-AMP, 3':5' GMP-нуклеотидгидролазы) (PDE), активность которых в свою очередь модулируется кальций кальмодулиновым комплексом (Орлов, 1987). Кроме того, активность АС может модулироваться через рецепторный вход и могут существовать АС и PDE, активность которых модулируется различными, не только  $\text{Ca}^{2+}$ , лигандами. В квазистационарном приближении, когда скорости изменения концентраций комплексов  $[ATPAC]$ ,  $[cAMP PDE]$  малы, получим:

$$\frac{d}{dt}[cAMP] = k_3 \cdot \left( \frac{[ATP] \cdot [AC^*]}{K_1 + [ATP]} \right) - k_4 \cdot [cAMP] \cdot \frac{[PDE^*]}{K_2 + [cAMP]}, \quad (5)$$

где  $K_1 = (k_{-1} + k_3)/k_1$ ,  $K_2 = (k_{-2} + k_4)/k_2$ .

Стационарное решение уравнения (5) будет:

$$z = \frac{k \cdot A}{1 - k \cdot A}, \quad (6)$$

где  $z = [cAMP]/K_2$ ,  $A = [AC^*]/[PDE^*]$ ,  $k = k_3/k_4$ ,  $[AC^*] = [AC0] \cdot f_z(Ca^{2+})$ ,  $[PDE^*] = [PDE0] \cdot g(Ca^{2+})$ . Используя формулы для PDE, активность которой модулируется КМ с 4 связанными ионами  $Ca^{2+}$ , запишем

$$g(Ca^{2+}) = (1 - st) \cdot \frac{[KM0] \cdot \prod_{j=1}^4 L_{1,j}}{\left( K_{PDE} + [KM0] \cdot \prod_{j=1}^4 L_{1,j} \right)} \prod_{j=1}^4 L_{1,j} + st, \quad (7)$$

где  $K_{PDE}$  - равновесная константа диссоциации реакции комплексообразования КМ с PDE,  $[KM0]$  - общая концентрация КМ,  $st$  - постоянный уровень активности PDE.

Для АС, активность которых модулируется КМ с 0, 1, 2 связанными ионами  $Ca^{2+}$ , запишем:

$$f_z(Ca^{2+}) = (1 - st) \cdot \frac{[KM0] \cdot \sum_{i=0}^k \prod_{j=1}^4 L_{a(i,j),j}}{\left( K_{AC} + [KM0] \cdot \sum_{i=0}^k \prod_{j=1}^4 L_{a(i,j),j} \right)} \sum_{i=0}^k \prod_{j=1}^4 L_{a(i,j),j} + st, \quad (8)$$

где  $K_{AC}$  равновесная константа диссоциации реакции комплексообразования КМ с АС,  $st$  - постоянный уровень активности АС.

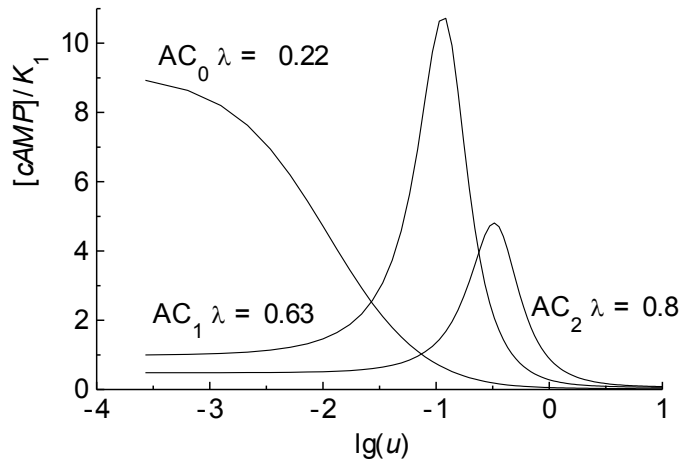


Рис. 10. Графики зависимости стационарного значения  $[cAMP]$  от  $[Ca^{2+}]$  для разных АС при определенных значениях  $\lambda$ . Для  $AC_0$   $\lambda = 0.222$ , для  $AC_1$   $\lambda = 0.63$ , для  $AC_2$   $\lambda = 0.88$  (получено из уравнений (12), (13), (14)).

На рис. 10 представлены теоретические кривые зависимости концентрации сАМР от концентрации  $Ca^{2+}$  при разных типах зависимости активности АС от концентрации  $Ca^{2+}$ .

Нами были получены аналогичные выражения для зависимости концентрации сGMP от концентрации  $Ca^{2+}$ .

### Электрофизиологические исследования возбудимой мембраны *P. caudatum*

У *P. caudatum* потенциал покоя составляет 25-30 мВ (Kamada, 1934; Yamaguchi, 1960; Kinoshita et al., 1964; Naitoh et al., 1972). При осуществлении реакции избегания (РИ) парамеций в начальный момент времени происходит обращение направления биения ресничек, обусловленное генерацией кальциевого спайка (Kung, 1975; Kung et al., 1992; Kung et al., 2000; Machemer et al., 1975; Machemer et al., 1989; Eckert, 1979; Adoutte et al., 1980, 1981; Hinrichsen et al., 1990, 1993; Jaren et al., 2000). На рис. 11 представлено изменение трансмембранной разности



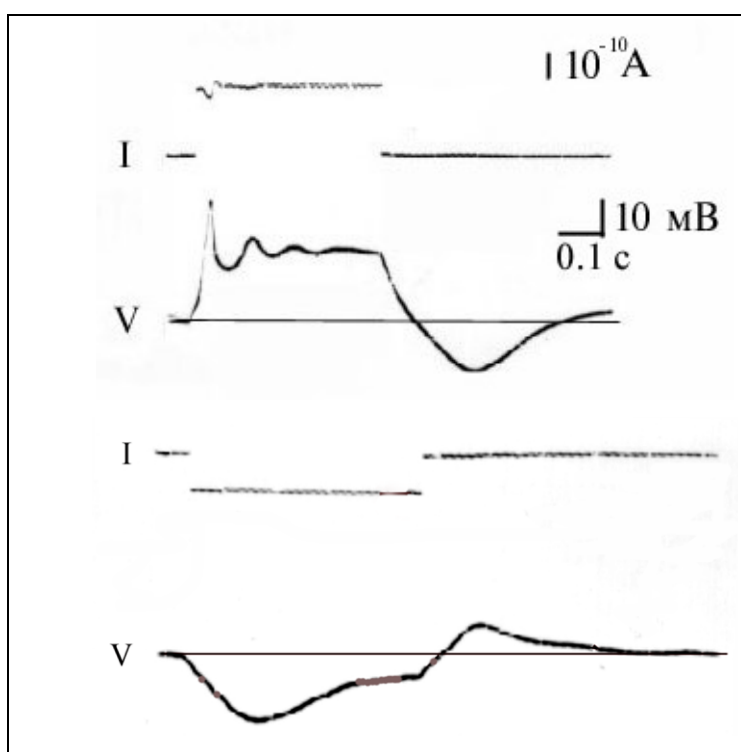


Рис. 11. Изменение трансмембранной разности потенциалов *P. caudatum* в ответ на прямоугольный импульс тока.

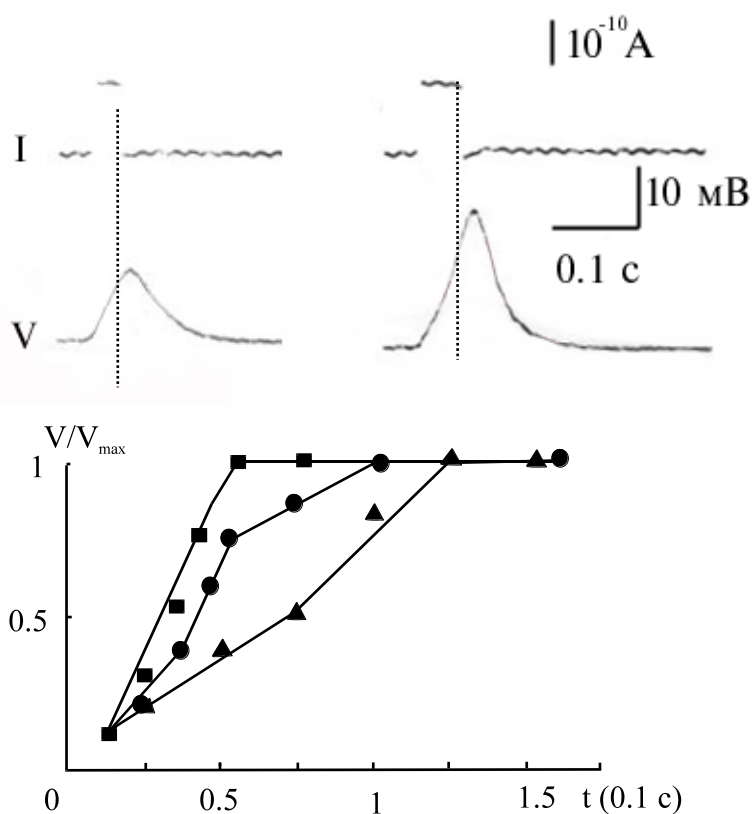


Рис. 15. Зависимость амплитуды кальциевого спайка ( $V/V_{\max}$ ) от длительности раздражающего импульса тока.  $\blacktriangle$  -  $I/I_p = 1.4$ ,  $\bullet$  -  $I/I_p = 4.5$ ,  $\blacksquare$  -  $I/I_p = 5.5$ . Амплитуда ответа нормализовалась к максимальному значению. (На графике представлены усредненные данные, полученные на 4-5 парамециях).

потенциалов *P. caudatum*, полученное нами, в ответ на прямоугольный импульс тока. В ответ на

деполяризующий импульс тока генерируется градуальный спайк, обусловленный быстрым входящим кальциевым током и задержанным калиевым током. Этот приводит к увеличению концентрации кальция в ресничках. Далее потенциал устанавливается вблизи потенциала покоя, происходит уход  $\text{Ca}^{2+}$  из ресничек. При этом парameция совершает сложное маневрирование. В начальный момент реснички резко меняют направление эффективного удара, парameция начинает двигаться задним концом вперед. Остальные фазы РИ разворачиваются на заднем фронте кальциевого спайка. Есть основания полагать, что при подаче гиперполяризующего тока резко уменьшается концентрация кальция в ресничках. Это приводит к резкому увеличению скорости движения парameций.

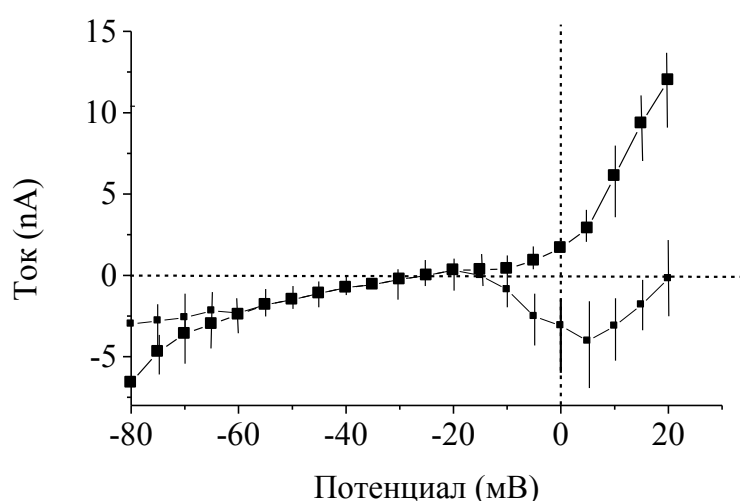


Рис. 13. Зависимость тока от потенциала по максимальным (■) и установившимся значениям (■) тока во временном интервале 25 мс. Нормальный раствор. Усредненные данные, полученные на 3-5 клетках. (*P. caudatum*,  $t^0$  – 18-20  $^{\circ}\text{C}$ ).

Мы исследовали зависимость параметров кальциевого спайка от длительности раздражающего импульса. На рис. 12 представлены кривые зависимости амплитуды кальциевого спайка от длительности раздражающего импульса тока прямоугольной формы. При разных амплитудах раздражающего импульса ответ достигает своего максимального значения при разных длительностях раздражающего стимула.

Сегодня можно говорить, что у парameций возбудимость построена на лиганд зависимых каналах. При генерации импульса в ответ на деполяризующий ток главную роль играют кальциевые каналы, ингибируемые кальцием, и калиевые каналы, проницаемость которых управляется кальцием через кальмодулин. В ответ на деполяризующий рецепторный потенциал увеличивается проницаемость кальциевых каналов, растет кальциевый ток, деполяризующий мембрану. Рост кальциевого тока приводит к увеличению концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ресничках. Кальций ингибирует кальциевые каналы и через кальмодулин увеличивает проницаемость калиевых каналов. Это приводит к восстановлению исходного потенциала. После чего концентрация кальция в ресничках возвращается к исходному значению. На рис. 13, 14 приведены вольтамперные характеристики возбудимой мембраны *P. caudatum*, полученные в условиях фиксации потенциала в растворе, содержащем 1мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 мМ  $\text{KCl}$ , pH = 7.2.

### Регулировка $\text{Ca}^{2+}$ в ресничках

В работе (Hook et al., 1979) была предложена математическая модель электровозбудимой мембраны парамеций.

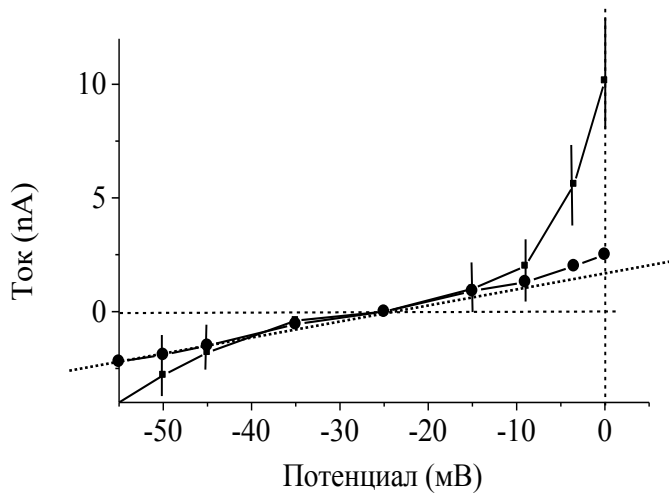


Рис. 14. Зависимость тока от потенциала по максимальным (■) и установившимся (●) значениям тока во временном интервале 100 с. Нормальный раствор. Усредненные данные, полученные на 3-5 клетках. (*P. caudatum*,  $t^0$  – 18-20  $^{\circ}\text{C}$ ).

Сейчас есть новые данные, которые позволяют по новому подойти к построению такой модели.

Динамика изменения  $\text{Ca}^{2+}$  в отдельной ресничке будет описываться следующим уравнением:

$$V_R \cdot \frac{d[\text{Ca}^{2+}]}{dt} = \frac{S_R}{z \cdot F} \cdot (I_{Ca}^P + I_{Ca}^A + I_{Ca}^T + I_{Ca}^u) + J([\text{Ca}^{2+}], [\text{CM0}]), \quad (9)$$

где  $V_R$  - объем, а  $S_R$  - площадь поверхности реснички,  $I_{Ca}^P, I_{Ca}^A, I_{Ca}^T$  -  $\text{Ca}^{2+}$  токи: через каналы пассивного транспорта, активного транспорта и ток из реснички в тело клетки соответственно,  $I_{Ca}^u$  -  $\text{Ca}^{2+}$  ток утечки.  $J([\text{Ca}^{2+}], [\text{CM0}])$  связывание  $\text{Ca}^{2+}$  кальмодулином.

Уравнения динамики концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ресничках ( $u$ ), трансмембранной разности потенциалов ( $\psi$ ), может быть представлена следующем виде:

$$\begin{aligned} \frac{d\omega}{d\eta} &= ka \cdot u \cdot (1 - \omega) - kb \cdot \omega, \\ \frac{dc}{d\eta} &= -c \cdot cac0 \cdot \frac{u}{k_c + u} + (1 - c), \\ \frac{dv1}{d\eta} &= k \cdot (1 - v1) \cdot cm_4 - n \cdot v1, \end{aligned} \quad (10)$$

$$\frac{du}{d\eta} = s \cdot \left( -b \cdot (c(u) \cdot v(\psi) + v_{Ca}^{st}) \cdot \left( \psi - 0.5 \cdot \ln \left( \frac{u_{out}}{u} \right) \right) - \beta \cdot \omega + vCat \cdot v_t(\psi) \cdot \left( \psi_{tr} - 0.5 \cdot \ln \left( \frac{u}{u_t} \right) \right) \right),$$

$$\begin{aligned} \frac{d\psi}{d\eta} &= -p \cdot ((-b \cdot (c(u) \cdot v(\psi) + v_{Ca}^{st}) - vCah \cdot v_h(\psi)) \cdot \left( \psi - 0.5 \cdot \ln \left( \frac{u_{out}}{u_t} \right) \right) - \\ &- b1 \cdot (v_K(\psi) + vKca \cdot v_K^1(u, \psi) + v_K^{st}) \cdot (\psi - \psi_K) + I_0) \end{aligned}$$

где  $n = k^- / n^-$ ,  $k = k^+ \cdot [\text{CM00}] / n^-$ ,  $v1 = N1 / N$ ,  $cm_4 = [\text{CM}_4] / [\text{CM00}]$ ,  $[\text{CM00}]$  - общая концентрация кальмодулина,  $\psi = V_m \cdot F / R \cdot T$ ,  $\omega = N_{Ca}^{A1} / N_{Ca}^{00}$ ,  $\eta = n^- \cdot t$ ,  $ka = k_A^+ \cdot K_{CM} / n^-$ ,

$$kb = (k_A^- + k_A^p) / n^-, u = [Ca^{2+}] / K_{CM}, c = [C] / [C0], k_C = K_C / K_{CM}, c_{ac0} = [CaC0] / K_{CC}.$$

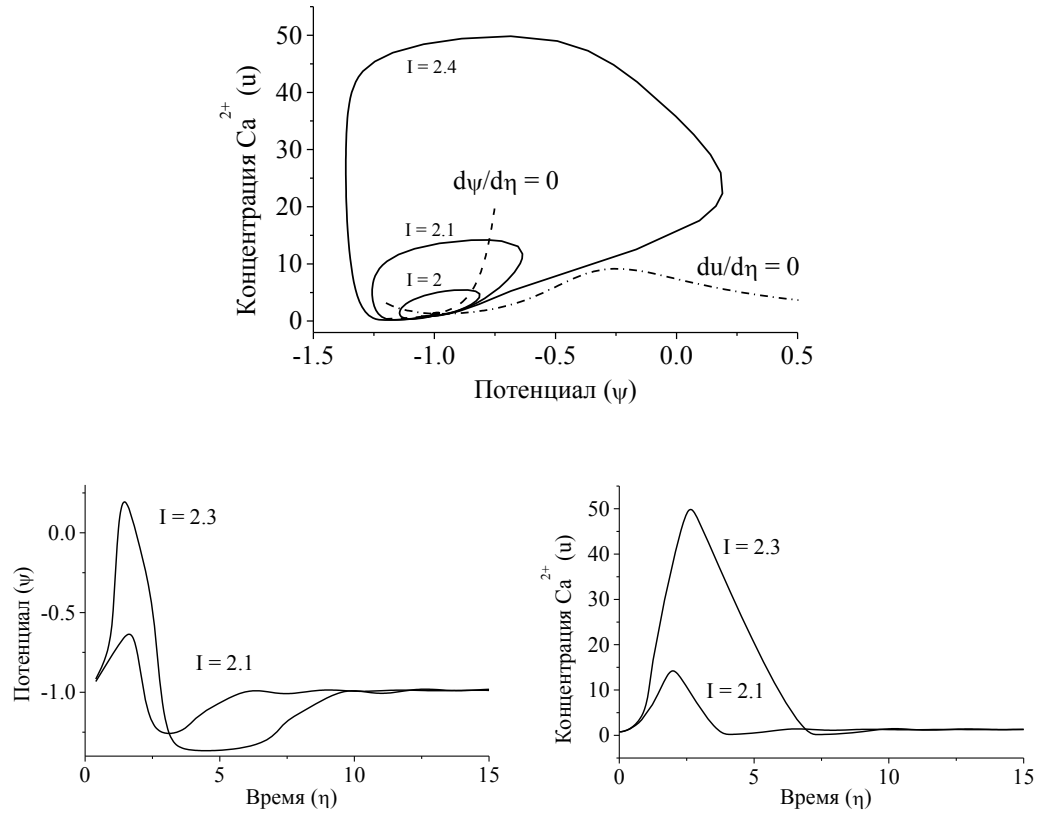


Рис. 15. Реакция модели на ступенчатое изменение деполяризующего тока ( $I$ ).

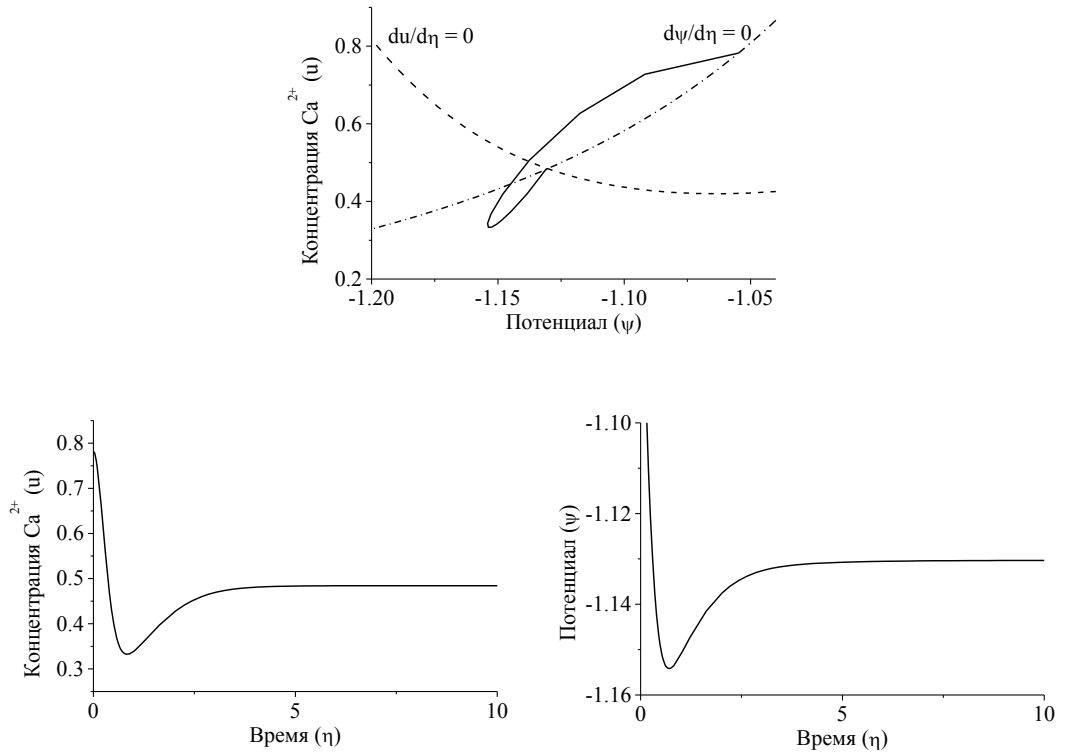


Рис. 16. Ответ модели на гиперполяризующие импульсы тока  $I_0 = -2$ .

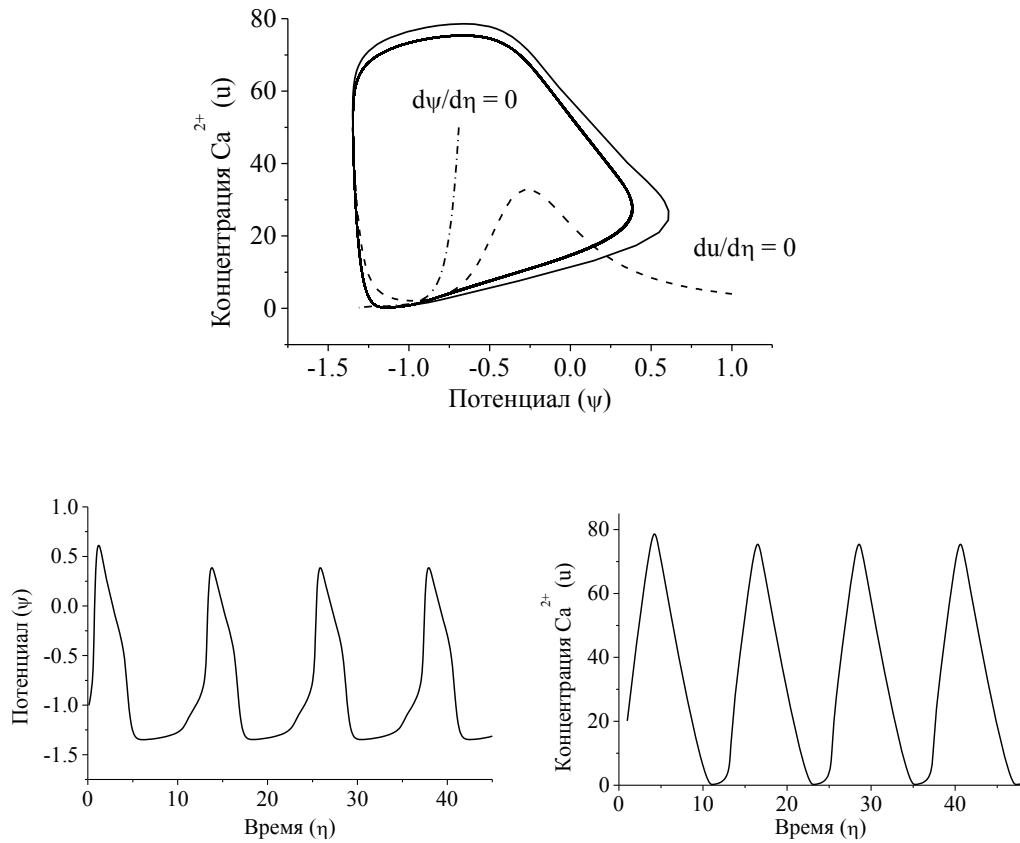


Рис. 17. Автоколебательный режим модели.

Меняя амплитуду внешнего тока  $I_0$ , мы исследовали динамику поведения уравнений (16) при начальных условиях, соответствующих нулевому значению  $I_0$ . На рис. 15 представлен фазовые траектории на плоскости переменных  $u, \psi$ , потенциальные и токовые ответы нашей модели (уравнения 16) при следующих значениях параметров:  $u_i = 0.07, u_{out} = 1000, \psi_{tr} = -0.1, s = 1.15, \rho = 0.17, b = 9, \beta = 0.1, sac0 = 12, vKca = 2, vCah = 1, b1 = 25, kb = 0.2, ka = 0.1, v_{Ca}^{st} = 0.01, v_K^{st} = 0.3, vCat = 4, p = 0.2, m = 1, kka = 0.1, kkb = 0.5$ .

В ответ на деполяризующие импульсы тока наша модель отвечает градуальными одиночными импульсами изменения концентрации кальция. На рис. 16 приведены ответы нашей модели на гиперполяризующие импульсы тока. В ответ на гиперполяризующий импульс тока формируется отрицательный импульс концентрации кальция. При изменении соотношения калиевой и кальциевой проницаемости модель переходит в автоколебательный режим. На рис. 17 представлен фазовый портрет и колебания концентрации кальция и потенциала при  $b1 = 15$ , остальные параметры имеют те же значения, что и в предыдущем случае. Таким образом, можно видеть, что наша модель качественно хорошо воспроизводит динамику поведения возбудимой мембраны парамеций. В ответ на деполяризующие импульсы тока генерируется градуальный кальциевый спайк, на гиперполяризующие импульсы тока

генерируется отрицательный кальциевый спайк. При определенном изменении параметров модели она переходит в автоколебательный режим.

### Моделирование двигательных реакций парameций

#### Механическая модель парameции

Для моделирования двигательной активности парameций нами была построена механическая модель. В этой модели тело инфузории представляется как шар с двумя условными "ресничками". Направление эффективного удара этих условных ресничек совпадает с направлением распространения метакрональных волн. Движение этого шара в лабораторной системе координат ( $e^1$ ) описывается уравнением:

$$\bar{v}^1 = \bar{F}^1 / 6 \cdot \pi \cdot \mu \cdot R_{\text{ш}},$$

где  $\bar{F}$  - сила, создаваемая ресничным двигателем,  $\bar{v}$  - скорость движения клетки,  $R_{\text{ш}}$  - радиус шара,  $\mu$  - динамическая вязкость воды. Если вектор  $\bar{F}$  определен в системе координат, жестко связанной с телом клетки ( $e^2$ ), то вектор  $\bar{F}$  в  $e^1$  равен:

$$\bar{F}^1 = A^{21} \cdot \bar{F}^2,$$

где  $A^{21}$  - матрица направляющих косинусов.

Сила  $\bar{F}$  создается ресничками, совершающими колебательные движения, которые можно разделить на фазу удара и фазу возврата. Тяговое усилие этого ресничного двигателя обращается в нуль при частоте не равной нулю. Связано это, видимо, с тем, что при малых частотах колебаний ресничек длительности фаз удара и возврата становятся одинаковыми по времени и это приводит к тому, что тяговое усилие, развиваемое ресничным двигателем, приближается к нулю. Для сил и моментов в  $e^2$  можно записать следующие выражения:

$$\begin{aligned} F_1^2 &= \gamma_0 \cdot f \cdot (\cos(\alpha_1) + \cos(\alpha_2)), \\ F_2^2 &= \gamma_0 \cdot f \cdot (\sin(\alpha_1) + \sin(\alpha_2)), \\ F_3^2 &= 0, \\ M_1^2 &= h_2 \cdot \gamma_0 \cdot f \cdot (\sin(\alpha_1) - \sin(\alpha_2)), \\ M_2^2 &= -h_2 \cdot \gamma_0 \cdot f \cdot (\cos(\alpha_1) - \cos(\alpha_2)), \\ M_3^2 &= -h_1 \cdot \gamma_0 \cdot f \cdot (\sin(\alpha_1) + \sin(\alpha_2)), \\ \bar{\omega}^2 &= \bar{M}^2 / 8 \cdot \pi \cdot \mu \cdot R_{\text{ш}}^3, \\ \bar{v}^2 &= \bar{F}^2 / 6 \cdot \pi \cdot \mu \cdot R_{\text{ш}}. \end{aligned} \tag{11}$$

При постоянных  $F$  и  $M$  парameция будет двигаться по спиральной траектории. Для радиуса ( $R$ ) и шага ( $H$ ) спиральной траектории нами были получены следующие выражения:

$$H = \frac{8 \cdot \pi \cdot R_{ye}^2 \cdot \operatorname{tg} \beta}{3 \cdot h_2 \cdot ((\operatorname{tg} \beta)^2 + k_{11} \cdot (\sin \alpha)^2)},$$

$$R = \frac{4 \cdot R_{ye}^2 \cdot \sin(\alpha) \cdot \sqrt{k_{11}}}{3 \cdot h_2 \cdot ((\operatorname{tg} \beta)^2 + k_{11} \cdot (\sin \alpha)^2)}.$$
(12)

где  $\alpha = (\alpha_2 + \alpha_1)/2$ ,  $\beta = (\alpha_2 - \alpha_1)/2$ ,  $k_{11} = (h_1/h_2)^2$ .  $\alpha_1, \alpha_2$  - направления эффективного удара ресничек на разных сторонах тела парameций.

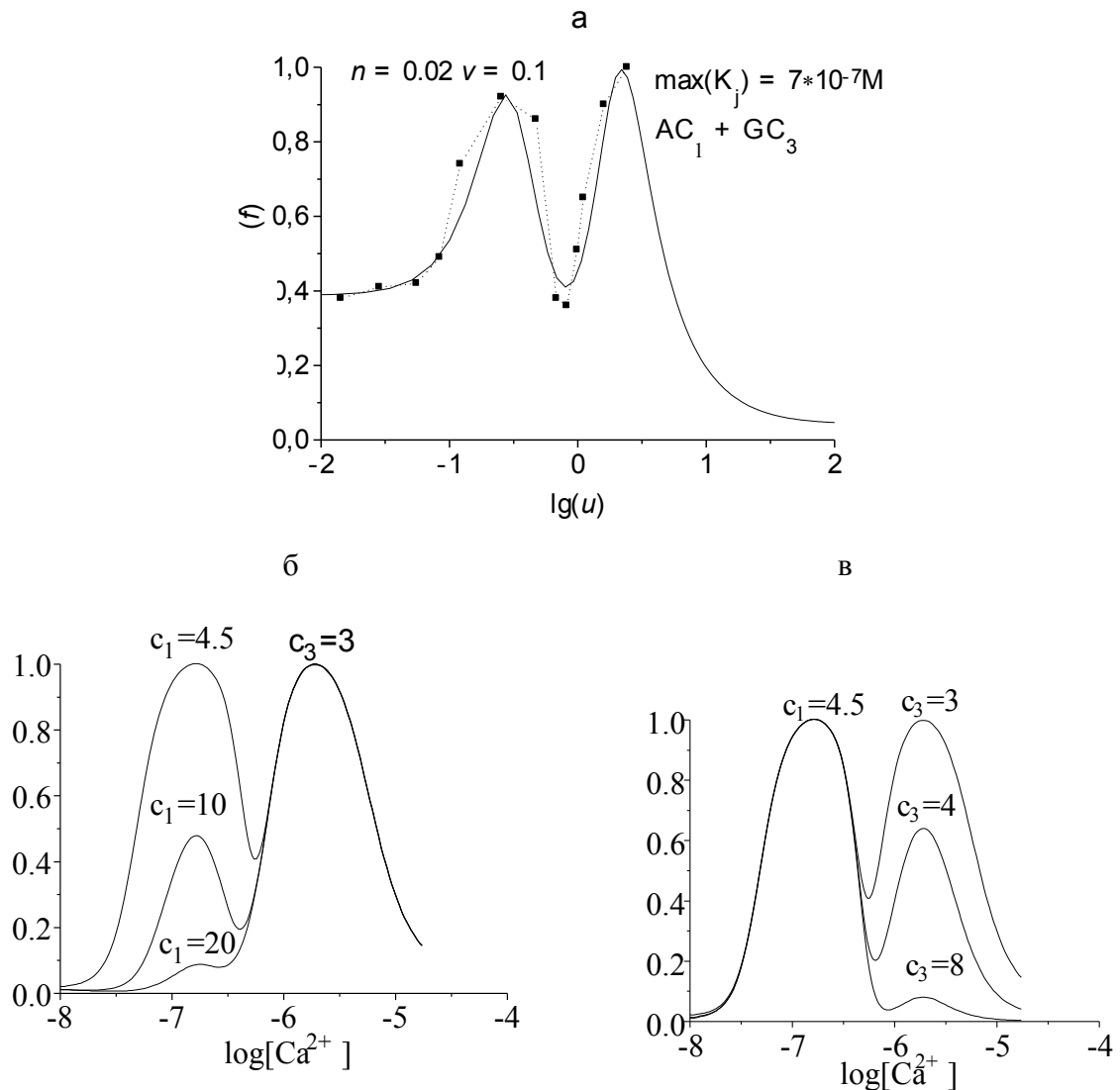


Рис. 18. Зависимость частоты биения ресничек от концентрации  $Ca^{2+}$ . а) ■ - экспериментальные результаты (Nakaoka, 1984), сплошная линия - теоретическая кривая; б) при различных значениях активности АС в) при различных значениях активности ГС  $u = [Ca^{2+}]/\max(K_j)$ .

Кроме того, нами были получены формулы, которые позволяют по характеристикам движения парameций ( $v_z$ ,  $R$ ,  $H$ ) получить частоту и направления эффективного удара ресничек. Частоту биения ресничек -  $f$  и направления эффективного удара ресничек -  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  можно получить по следующим формулам:

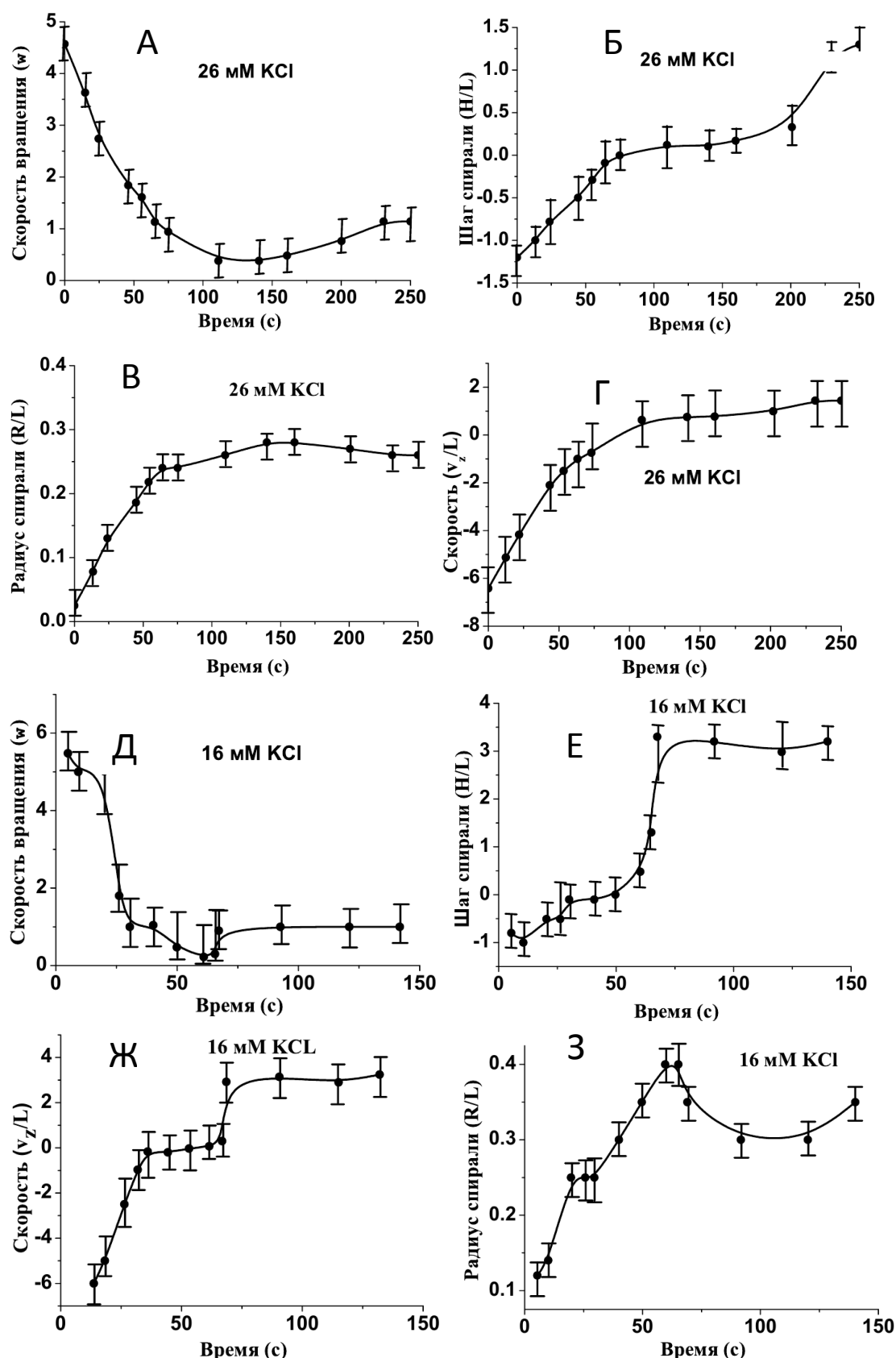


Рис. 19. Экспериментальные зависимости характеристик движения *Paramecium caudatum* от времени при выполнении реакции избегания в растворах А-Г) 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 26 mM KCl, pH = 7.2.; Д-З) 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 16 mM KCl; pH = 7.2. (Каждая точка получена на основе усреднения результатов, полученных на 6 - 15 клетках. Все линейные размеры даны в относительных единицах L (длина тела клетки), время в с.



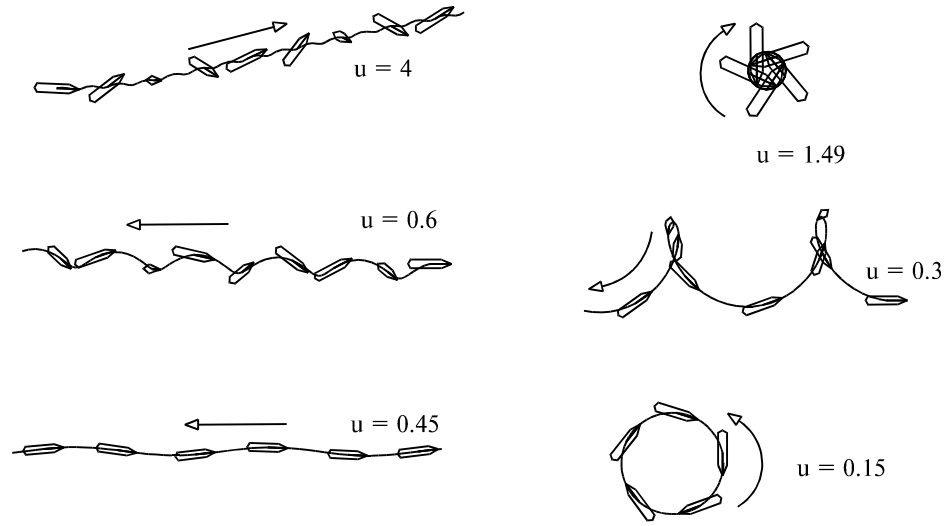


Рис. 20. Расчетные траектории движения модели при различных значениях концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ресничках.  $u = [\text{Ca}^{2+}]/K_{\text{CM}}$ .

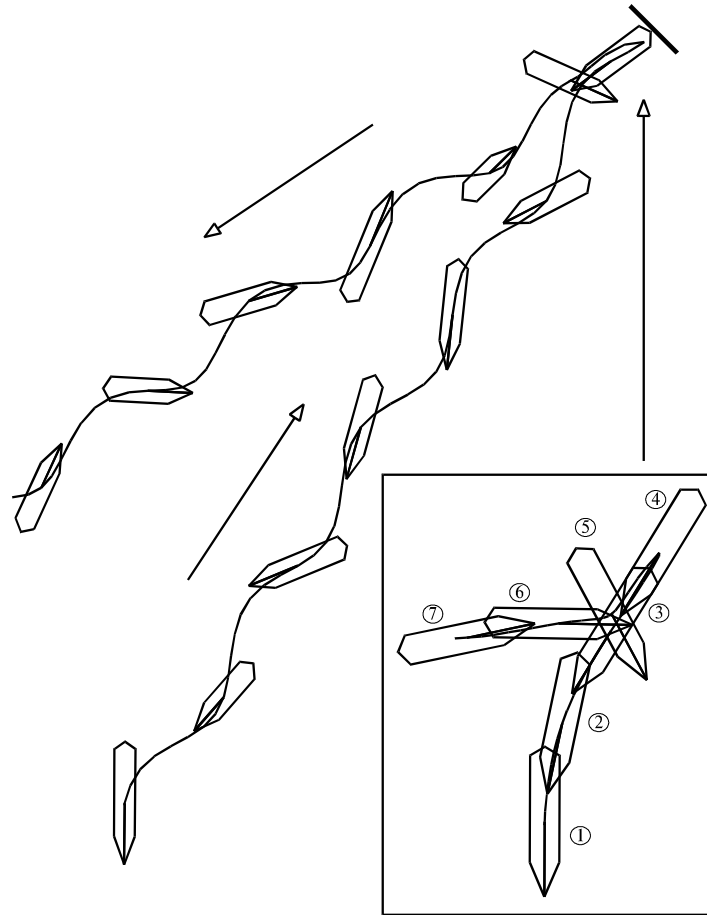


Рис. 21. Расчетные траектории движения модели при импульсном изменении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ресничках.

$$f = \frac{3 \cdot \pi \cdot R_{ye} \cdot \mu}{\gamma_0} \cdot v_z \cdot \frac{\sqrt{4 \cdot \pi^2 \cdot R^2 + H^2}}{H} \cdot \sqrt{1 + \frac{64 \cdot \pi^2 \cdot R_{ye} \cdot H^2}{9 \cdot h_2^2 \cdot (4 \cdot \pi^2 \cdot R^2 + H^2)^2}} \cdot (13)$$

При  $H = 0$

$$f = \frac{3 \cdot \pi \cdot R_{ye} \cdot \mu}{\gamma_0} \cdot \omega \cdot R. \quad (14)$$

Для углов  $\alpha_1, \alpha_2$ :

$$\alpha_1 = a \tan\left(\frac{8 \cdot \pi \cdot R_{ye}^2 \cdot H}{3 \cdot h_2 \cdot (4 \cdot \pi^2 \cdot R^2 + H^2)}\right) + a \sin\left(\frac{16 \cdot \pi^2 \cdot R_{ye}^2 \cdot R}{3 \cdot h_1 \cdot (4 \cdot \pi^2 \cdot R^2 + H^2)}\right), \quad (15)$$

$$\alpha_2 = a \sin\left(\frac{16 \cdot \pi^2 \cdot R_{ye}^2 \cdot R}{3 \cdot h_1 \cdot (4 \cdot \pi^2 \cdot R^2 + H^2)}\right) - a \tan\left(\frac{8 \cdot \pi \cdot R_{ye}^2 \cdot H}{3 \cdot h_2 \cdot (4 \cdot \pi^2 \cdot R^2 + H^2)}\right). \quad (16)$$

На рис. 18 представлены экспериментальные и теоретические данные зависимости частоты биения ресничек ( $f$ ) от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Разработанные нами методики исследования двигательной активности парameций позволяют с хорошей точности измерять  $v_z, R, H$ , а по ним получать  $f, \alpha_1, \alpha_2$ .

На рис. 19 представлены экспериментальные данные зависимости характеристик движения *P. caudatum* при выполнении ими затянутой реакции избегания, которая наблюдается в растворах с повышенной концентрацией KCl. На основе экспериментальных данных нами были определены параметры, входящие в нашу модель.

После того, как параметры модели были определены, мы исследовали двигательную активность нашей модели при различных значениях концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ресничках. На рис. 20 приведены расчетные траектории движения нашей модели при различных значениях концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  ( $u$ ) в ресничках. На рис. 21 приведены расчетные траектории движения модели при импульсном изменении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ресничках. В начальный момент времени концентрация кальция скачком меняется до уровня  $u_0$  и затем по экспоненте с определенным  $\tau$  возвращается к исходному значению. Расчеты показывают, что начальное значение  $u_0$  и  $\tau$  определяют угол, на который повернет парameция.

### Анализ реакции оборонительного ускорения

Одной из двигательных реакций, построенной на управлении ресничками, является реакция оборонительного ускорения (РОУ) (Jennings, 1906; Серавин, 1967; Naitoh, 1974). Несмотря на то, что двигательные реакции парameции исследуются уже давно, нам не удалось найти количественных характеристик РОУ. Не ясен пока и механизм этой реакции.

РОУ - это ответ клетки на механическое раздражение ее заднего конца. После раздражения скорость ее движения резко увеличивается, а затем спадает до начального уровня. На рис. 22 даны графики изменения скорости движения парameций (усреднение по 4-5 клеткам) в момент осуществления РОУ при разных температурах.

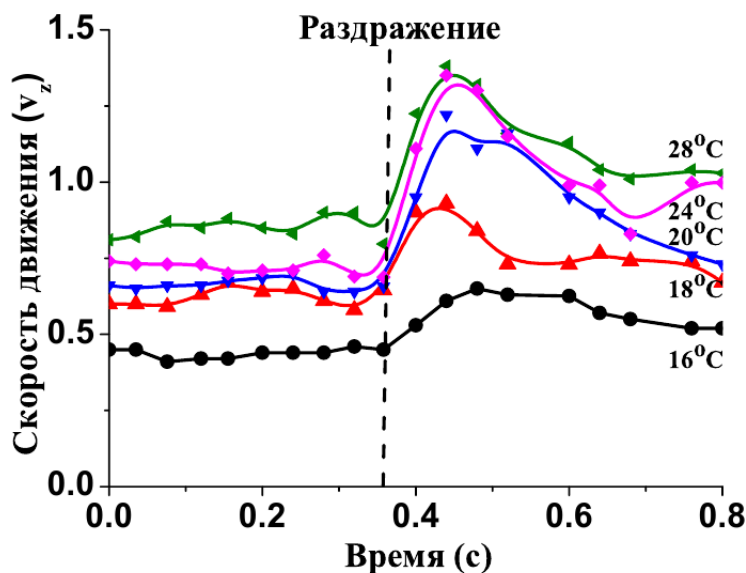


Рис. 22. Графики изменения скорости движения *P. caudatum* при выполнении РОУ в нормальном растворе при различных температурах.

При температуре 12°C парameции перестают реагировать на механическое раздражение, плаывая при этом со средней скоростью около 0.3 мм/с. Можно предположить, что основным током, определяющим уменьшение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в

ресничках при запуске РОУ является ток  $\text{Ca}^{2+}$  из ресничек в тело клетки.

Есть основания полагать, что в основании реснички существует особый селективный фильтр. Об этом говорят следующие данные. При запуске реакции избегания концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в ресничках увеличивается на два порядка и затем возвращается к исходному уровню. В деполяризующих растворах продолжительность попятного движения может составлять более 100 с. (Hildebrand, 1978; Doughty, 1978). Это значит, что на это время концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в ресничках превышает концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в теле клетки на порядки. Если бы в основании реснички не было селективного фильтра, то концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в ресничках достаточно быстро (за время менее 20 мс) сравнивалась бы с концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  в теле клетки, и никакого продолжительного попятного движения не было бы. Являясь барьером для  $\text{Ca}^{2+}$ , этот фильтр электрически не изолирует ресничку от тела клетки. По измерениям емкости клетки была проведена оценка эквипотенциальности ее цитоплазмы. Было получено, что вся цитоплазма, включая цитоплазму ресничек, эквипотенциальна (Dunlap, 1977). Это значит, что этот фильтр хорошо проницаем для каких-то ионов, например  $\text{K}^+$ . Кроме того, реснички являются непрерывно работающими эффекторами, потребляющими АТФ. В ресничках нет митохондрий, они располагаются в теле клетки. Следовательно АТФ поступает в реснички из тела клеток, а АДФ из ресничек в тело клетки. Таким образом, фильтр, расположенный в основании реснички, хорошо проницаем для одних ионов и плохо проницаем для других.

Можно предположить, что проницаемость этого фильтра для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  зависит от разности потенциалов на цитоплазматической мембране.

#### Анализ движения парameций по типу "стохастический клубок"

При движении парameций по типу стохастический клубок скорость движения клеток в несколько раз меньше чем в нормальном растворе. Само движение сопровождается достаточно

частой сменой шага, радиуса спирали и ориентации главного момента. Такой тип движения мы наблюдали у хорошо адаптированных к культуральной среде парameций, относительные смещения парameций при этом минимальны.

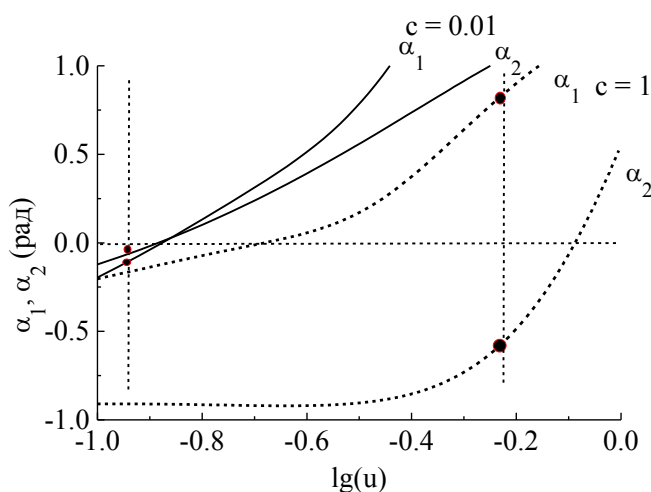


Рис. 23. Зависимость углов  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  при двух уровнях активности АС ( $c = 1$ ,  $c = 0.01$ ).

На рис. 23 представлена зависимость углов  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$  от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  при двух уровнях активности АС  $c = 1$ ,  $c = 0.01$  (получено на модели). При высоком уровне активности АС ( $c = 1$ ) и концентрации  $[\text{Ca}^{2+}] = 0.6$  углы  $\alpha_1 = 0.85$ ,  $\alpha_2 = -0.55$  (движение по спирали с малым

радиусом и большим нагом), при низком уровне активности АС ( $c = 0.01$ ) и  $[\text{Ca}^{2+}] = 0.15$  углы  $\alpha_1 = -0.05$ ,  $\alpha_2 = -0.06$  (движение по окружности с шагом близким к нулю). Сейчас можно сказать, сопоставляя расчеты на модули с экспериментальными результатами, что экспериментально наблюдаемые параметры движения парameций обусловлены разными уровнями концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и разными уровнями активности АС.

В представленной нами модели пока не учитывалось, что разность потенциалов на цитоплазматической мембране непрерывно флуктуирует. Флуктуации мембранного потенциала парameций исследовались в работе (Majama, 1980). При флуктуации мембранного потенциала на  $\Delta\varphi = \pm 5$  мВ концентрация кальция должна флуктуировать  $\Delta[\text{Ca}^{2+}] = \pm 2 \cdot 10^{-7}$  М при среднем значении  $[\text{Ca}^{2+}] = \pm 3 \cdot 10^{-7}$  М.

Флуктуации концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ресничках будут приводить к флуктуациям параметров движения. Это в свою очередь приведет к тому, что траектория движения парameций будет напоминать "стохастический клубок", возникающий в результате больших изменений шага и радиуса спиральной траектории.

#### **Теоретическая интерпретация двигательной активности *Paramecium caudatum* во внешнем электрическом поле и градиентных полях концентраций биологически активных соединений**

Теоретические расчеты показывают, что в градиентных полях определенных факторов, способных оказывать влияние на характер биения ресничек, *P. caudatum* будут двигаться по градиенту этих факторов. Направление движение будет совпадать с направлением увеличения амплитуды фактора, уменьшающего частоту биения ресничек. Нами предложен способ описания ориентирующего воздействия электрического поля на инфузории. Рассмотрены

возможные механизмы этого явления. Это позволило получить качественный вид всех встречающихся при гальванотаксисе типов траекторий клеток. Характерные траектории движения инфузорий в присутствии таких факторов показаны на рис. 24. На рис. 24а показаны траектории движения *P. caudatum* во внешнем электрическом поле (ВЭП), а рис. 24б в градиенте концентраций KCl.

### Механизмы ориентирующего действия ВЭП.

Мы обнаружили, что при включении ВЭП клетки после возможного кратковременного (доли секунды) хаотического движения начинают упорядоченное вращательное поступательное движение. В упрощенном случае характерные траектории такого движения (см. рис.25а), являются решением следующего уравнения:

$$\xi_r \cdot \dot{\varphi} + M_E \cdot \sin(\varphi) = 0, \quad (17)$$

где  $\xi_r = 8 \cdot \pi \cdot \mu \cdot R_{eq}^3$  - коэффициент сопротивления,  $\mu$  - динамическая вязкость (Н·с/м<sup>2</sup>),  $R_{eq}$  - эквивалентный радиус клетки,  $\varphi$  - угол между направлением оси спирали и направлением поля,

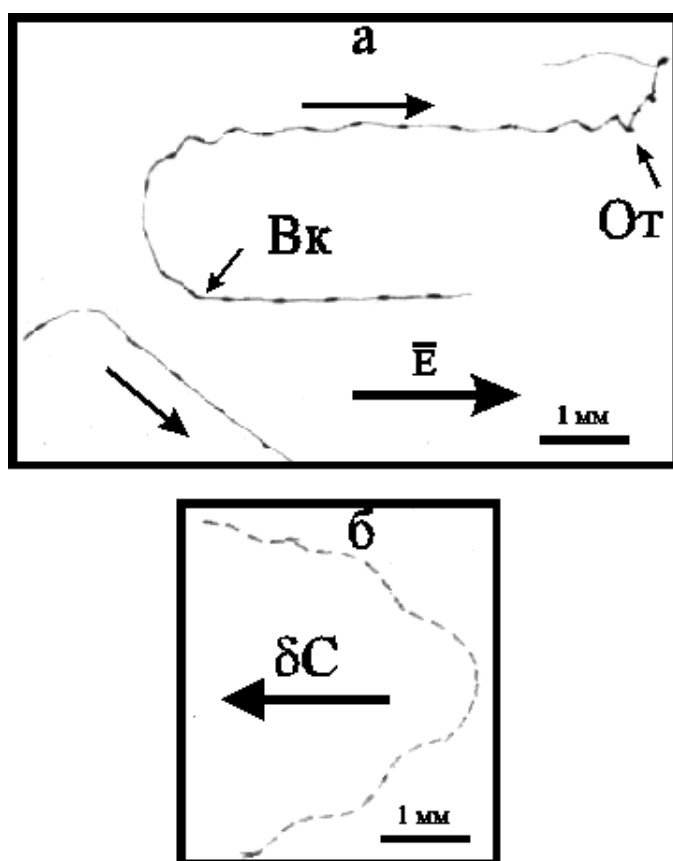


Рис. 24. Стробогаммы движения *Paramecium caudatum* а) электрическом поле (E), момент включения поля Вк, отключения От, б) в градиенте KCl ( $\delta C$ ). Частота стробирования 3 всп/с для а и б. Температура 18-20 °С. Фотографии получены в темнопольном микроскопе в ячейке размером 53х21х0,1 мм с постоянной и стробоскопической подсветкой (частота вспышек 3 Гц). Напряжение на электродах из платиновой проволоки 5 В. Стрелки указывают на положение клетки в момент включения поля. Катод расположен параллельно правому краю фотографий.

$\varphi_0$  - начальное значение угла в момент включения поля, а  $M_E$  - амплитуда момента силы, вращающего клетку в ВЭП. (В общем случае  $M_E$  будет зависеть от  $\varphi$ .)

Решение уравнения (23) при  $M_E = \text{const}$  будет:

$$\varphi(t) = 2 \cdot \arctg[\tg(\varphi_0 / 2) \cdot \exp(-M_E \cdot t / \xi_r)].$$

Это уравнение удовлетворительно аппроксимирует траекторию движения инфузории в ВЭП, если ресничный двигатель сообщает инфузории скорость

$$v = F/\xi_r, \quad \xi_r = 8 \cdot \pi \cdot \mu \cdot R_{eq}.$$

Нами показано, что предложенные механизмы влияния ВЭП на движение клеток *P. caudatum* позволяют получить качественный вид всех основных типов траекторий инфузорий в условиях гальванотаксиса: разворот по полю, движение под постоянным углом к полю и вращение вокруг внешней по отношению к телу клетки оси. Мы полагаем, что могут иметь место два различных механизма влияния ВЭП на траектории движения инфузорий. Градиент потенциала будет оказывать различное влияние на частоту биения ресничек, расположенных с разных сторон (относительно электродов) тела парамеции. Кроме того, парамеции могут иметь собственный заряд, центр расположения которого не совпадает с центром гидродинамического сопротивления. Однако относительная величина вклада каждого из них должна заметно зависеть как от изменения напряженности ВЭП, так и от физиологического состояния инфузории.

### Исследование систем управляющих формой тела парамеций

Данный тип поведения парамеций в агаровых капиллярах АК является следствием наличия условий пространственного ограничения, когда клетка передвигается в полостях, характерные размеры которых меньше длины тела. Однако, эти условия есть и в СК, хотя реакция разворота там не наблюдается. Это означает, что свойства материала, из которого изготовлен капилляр, важны. Нами показано, что мембранный электрогенез не принимает участия в организации реакции разворота парамеций.

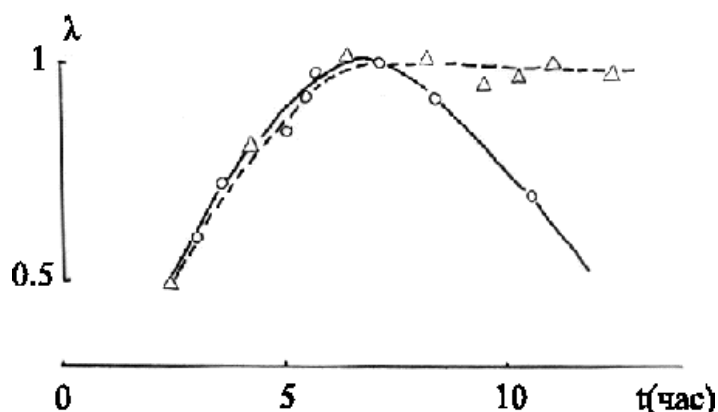


Рис. 25. Зависимость  $\lambda$  от времени при двух разных температурах  $18^{\circ}$  ( $\Delta$ ) и  $24,6^{\circ}$  ( $\circ$ ). Клетки *P. caudatum* клоны М-496, М-497.

Мы измеряли постоянную времени нарастания потенциала при раздражении одной из конъюгирующих клеток парочки парамеций прямоугольными гиперполяризующими импульсами тока, которые приводили к смещению потенциала на 5-7 мВ. Легко показать, что параметр  $\lambda$  является мерой закороченности конъюгирующих парамеций:

$$\lambda = \frac{\tau_{\text{yen}}}{\tau_{\text{a0}}} = \frac{\tau_{\text{yen}}}{R \cdot (S_1 + S_2) \cdot C_{\text{oa}}},$$

где  $R$  - суммарное сопротивление мембраны парочки;  $S_1$ ,  $S_2$  - площади поверхности цитоплазматической мембраны каждой клетки,  $\tau_{\text{экс}}$  - экспериментальное значение постоянной

времени. На рис. 25 приведены экспериментальные данные изменения параметра  $\lambda$  парочки конъюгирующих парameций

### Заключение и выводы

1. Нами проведено исследование феноменологии двигательной активности *P. caudatum*. Показано, что парameции имеют набор, включающий в себя, по крайней мере, 10 двигательных реакций: 1) реакция избегания, 2) реакция неограниченного попятного движения, 3) реакция оборонительного ускорения, 4) реакция «стохастический клубок», 5) движение в контакте с ограничивающей поверхностью, 6) тигмотаксис (полная остановка движения), 7) реакции таксисов (хемо, фото, гео и т.п.), 8) реакция поиска комплиментарной зоны полового партнера, 9) реакция разворота в условиях ограниченного пространства, 10) выстрел трихоцист. Пять реакций (2, 4, 5, 8, 9) описаны нами впервые. Пять реакций описаны в начале прошлого века. Набор этих реакций позволяет парameциям решать самые различные двигательные задачи: поиска питательных веществ и благоприятных факторов внешней среды, поиска комплиментарной зоны полового партнера, защиты от действий хищников и неблагоприятных факторов среды, преодоления различных механических препятствий.

2. Математическая модель, построенная нами, которая описывает зависимость концентрации молекулярных форм кальмодулина от концентрации кальция и магния дает возможность раскрыть свойства белка кальмодулина, которые используются в механизмах управления различными клеточными системами. Эти свойства кальмодулина позволяют монотонно изменяющейся сигнал концентрации кальция превратить в различную форму сигнала концентраций молекулярных форм кальмодулина: монотонно спадающую, монотонно растущую, колоколообразную с несколькими значениями положений максимумов. Сейчас можно говорить, что для ферментов, активность которых модулируется кальцием через кальмодулин, в процессе эволюции выбирается сопряжение с той формой кальмодулина, которая позволяет обеспечивать необходимые преобразования кальциевого сигнала при решении самых различных задач управления.

3. Математическое моделирование элементов, определяющих концентрацию свободного кальция в ресничках, позволяет нам утверждать, что на кальциевых каналах, ингибирующихся кальцием, на калиевых каналах, управляемых кальцием через кальмодулин, на катионных каналах, активирующихся при гиперполяризации, определенной зависимости свойств селективного фильтра, лежащего в основании ресничек, от разности потенциалов, может быть сформирована возбудимость такая же, как и у парameций: градуальный кальциевый спайк увеличения концентрации кальция в ресничках, амплитуда которого зависит от амплитуды рецепторного сигнала, автоколебательный режим изменения концентрации кальция в ресничках, отрицательный кальциевый «спайк» уменьшения концентрации кальция в

ресничках, запускающийся гиперполяризующими импульсами тока.

4. Математическое моделирование элементов и модулей, определяющих концентрацию циклических монофосфатов, позволяет нам утверждать, что аденилатциклаза парамеций активируется кальмодулином с одним связанным ионом кальция, гуанилатциклаза парамеций активируется кальмодулином с тремя связанными ионами кальция, фосфодиэстераза cAMP парамеций активируется кальмодулином с четырьмя связанными ионами кальция, фосфодиэстераза cGMP парамеций активируется кальмодулином с одним связанным ионом кальция.

5. Нами впервые показано, что на начальных этапах конъюгации возбудимая мембрана парамеций переходит в режим пачечной генерации импульсов. Этот режим управления двигателем клетки обеспечивает стыковку парамеций комплиментарными зонами.

6. Анализ экспериментальных данных и математическое моделирование позволяет нам утверждать, что зависимость частоты биения ресничек от концентрации кальция формируется на основе зависимостей активности ферментов синтеза и распада циклических монофосфатов от концентрации кальция и экзогенных лигандов.

7. На основе анализа полученных нами экспериментальных данных, мы полагаем, что на теле парамеций можно выделить две ресничные области с разными параметрами зависимости направления эффективного удара ресничек от концентрации циклических монофосфатов.

8. Экспериментальное исследование параметров стационарных движений парамеций и их анализ на модели показал наличие определенной зависимости параметров движения от уровня активности аденилатциклазы: при высоком уровне активности аденилатциклазы парамеции движутся по спиральным траекториям с малым радиусом, большим шагом спирали и большой скоростью движения. При этом наблюдаются флуктуации скорости движения клеток и незначительные изменения направления движения парамеций, обусловленные флуктуациями трансмембранной разности потенциалов приводящее к синхронным флуктуациям концентрации кальция в ресничках. Когда активность аденилатциклазы достигает определенного критически низкого уровня, происходит принципиальное изменение в характере движения парамеций. Парамеция начинает двигаться по окружности. При наличии флуктуаций мембранного потенциала ее траектория движения превращается в «стохастический» клубок, состоящий из отрезков движения клетки по прямой без вращения, по окружностям разного радиуса и разного направления вращения, по спиральным траекториям с большим и малым радиусом и шагом спирали. Математическое моделирование показывает, что такой переход обусловлен появлением в параметрах движения парамеций особой неустойчивости, характеризующейся резкой сменой радиуса и шага спиральной траектории в ответ на малые флуктуации мембранного потенциала. Эта неустойчивость обусловлена особенностями



зависимости направления эффективного удара ресничек от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и циклических монофосфатов.

9. Исследование реакции избегания на математической модели показывает, что угол, на который повернет клетка, определяется амплитудой кальциевого спайка. Амплитуда кальциевого спайка определяется амплитудой рецепторного сигнала.

10. В ориентирующий эффект внешнего электрического поля вносит дифференциальная активацией ресничек, расположенных на разных (по отношению к электродам) сторонах тела клетки и наличие у парameций дипольного момента. Теоретический анализ показывает, что наличие рецепторов, управляющих активностью аденилатциклазы на каждой ресничке по отдельности, может позволять парameциям двигаться по градиенту концентраций аттрактантов и против градиента концентраций репелентов.

11. Нами показано, что в условиях ограниченного пространства у парameций запускается реакция разворота, которая позволяет парameциям маневрировать в условиях ограниченного пространства. При запуске этой реакции трансмембранная разность потенциалов участия не принимает.

12. Анализ полученных нами результатов позволяет предположить, что компартментализация реснички основана на селективных свойствах «фильтра», лежащего в основании реснички, а проницаемость этого фильтра для кальция зависит от трансмембранной разности потенциалов.

#### **Основные результаты диссертации опубликованы в работах:**

1. Котов Н.В., Костылева Е.К., Валеева Н.Ш. Ионные токи и проводимость цитоплазматической мембраны парameций в условиях фиксации потенциал. // Сб. аспирантских работ: Точные науки: Физика. - Часть 1. Казань. Из-во Казанского ун-та. 1977. С. 66-71.
2. Котов Н.В., Бухараева Э.А. Реакция парameций на электромагнитные колебания видимой области спектра. Деп. в ВИНТИ N 2953-77. 1977. -С. 1-7.
3. Котов Н.В., Ведерников А.П., Костылева Е.К. Пассивные электрические свойства парameций. - Деп. В ВИНТИ N 2989-77, 1977. -№. 1-6.
4. Котов Н.В. Амебоидное движение *Paramecium caudatum*. - Деп. в ВИНТИ N 2949-77, -1977. -С. 1-9.
5. Котов Н.В. Поведение парameций в условиях ограниченного пространства: 1. Реакция разворота. // Цитология. - 1980. - N 5. -С. 597-601.
6. Котов Н.В. Поведение парameций в условиях ограниченного пространства: 2. Поведение в капилляре. // Цитология. - 1982.- N 4, -С. 462-467.
7. Котов Н.В., Ведерников А.П. Роль электрических процессов в организации двигательной активности *Paramecium caudatum*. - Деп. в ВИНТИ N 5597-82.- 1982. -С. 1-23.

8. Котов Н.В. Обездвиживание парameций ионами никеля. Деп. В ВИНТИ №502 -84. -С. 1-5.
9. Котов Н.В., Юдин И.Д., Мирошников В.В. Математическое моделирование механизма движения реснички: внутренний гидродинамический привод. // Биофизика. - 1992.- Т. 37, N 2, -С. 301-305.
10. Котов Н.В. Математическое моделирование механизмов регулирования кальцийкальмодулин зависимых элементов клетки. - Деп а ВИНТИ N 931-B94.- 1994.
11. Котов Н.В., Скоринкин А.И., Костылева Е.К. Моделирование кальций кальмодулин - зависимых ферментативных реакций. В сб. тез. "Математические модели нелинейных возбуждений, переноса, динамики, управления в конденсированных системах и других средах". - 1994. -С. 99.
12. Котов Н.В., Скоринкин А.И., Костылева Е.К. Модель реакции избегания инфузории *Paramecium caudatum*. // Цитология. - 1995.- Т 37, N 3.- С 249-256.
13. Юдин И.Д., Котов Н.В. Теоретическая интерпретация двигательной активности *Paramecium caudatum* во внешнем электрическом поле // Биофизика. - 1995. Т 40. Вып. 6. С. 1285-1290.
14. Котов Н.В., Скоринкин А.И., Костылева Е.К. Моделирование кальцийзависимых ферментативных реакций // Журнал физической химии. - 1995.- Т.69, N 8, С. 1438-1444.
15. Котов Н.В., Скоринкин А.И., Костылева Е.К. Моделирование механизмов управления двигательной активностью парameций. - Деп. в ВИНТИ N 1213-B95.- 1995.
16. Садыков И.Х., Котов Н.В. Моделирование кинетики реакции комплексообразования белка, имеющего n центров связывания с лигандами. В сб. статей "Структура и динамика молекулярных систем". Йошкар-Ола - Казань - Москва. Изд-во МарГТУ. 1996.-С. 143-146.
17. Котов н.В., Садыков И.Х., Даминов Р.В. Функция кальмодулина в контурах управления активностью кальцийкальмодулин зависимых элементов клетки. Деп. В ВИНТИ № 883-B96. 1996. С. 1-27.
18. Садыков И.Х., Котов Н.В. Моделирование процесса регулирования активности аденилатциклазы ионами кальция. В сб. статей "Структура и динамика молекулярных систем". Йошкар-Ола - Казань - Москва. Изд-во МарГТУ. 1996.-С. 139-142.
19. Литвин В.Г. Котов Н.В. Моделирование реакции оборонительного ускорения парameций. В сб. тезисы докладов "II республиканская научная конференция молодых ученых и специалистов" 1996. Казань. Книга 1. -С. 12.
20. Платов К.В. Котов Н.В. Моделирование динамики активности cAMP- зависимой протеинкиназы. В сб. тезисы докладов "II республиканская научная конференция молодых ученых и специалистов" 1996. Казань. Книга 1. -С. 31.
21. Давыдов Д.А., Литвин В.Г., Платов К.В., Садыков И.Х., Котов Н.В. Исследование

- аденилатциклазной системы клетки. Сб. статей "Структура и динамика молекулярных систем". - Йошкар-Ола - Казань - Москва. Изд-во МарГТУ. 1997.-. Часть 4. -С. 30-34.
22. Волченко А.М., Давыдов Д.А., Платов К.В., Котов Н.В. Молекулярные механизмы генерации лиганд-зависимого кальциевого спайка. В сб. статей "Структура и динамика молекулярных систем". Йошкар-Ола - Казань - Москва. Изд-во МарГТУ. 1998. С. 46-50.
  23. Волченко А.М., Давыдов Д.А., Костылева Е.К., Садыков И.Х., Платов К.В., Котов Н.В. Двигательная активность *Paramecium*. В сб. тез. "Проблемы теоретической биофизики". - М, 1998. - С. 143.
  24. Давыдов Д.А., Платов К.В., Котов Н.В. Моделирование поведения многоцентровых молекул. В сб. тез. "Актуальные проблемы нейробиологии". - Казань, 1998. - С. 38-40.
  25. Волченко А.М., Давыдов Д.А., Платов К.В., Котов Н.В. Генерация лиганд-зависимого кальциевого спайка. Тез. "Актуальные проблемы нейробиологии". - Казань, 1998. - С. 34-35.
  26. Литвин В.Г., Самигуллин Д.В., Котов Н.В. Исследование реакции оборонительного ускорения *Paramecium caudatum* // Биофизика, 1999. Т. 44, №2. С. 296-302.
  27. Валеев Н.В., Давыдов Д.А., Котов Н.В. Теоретическое исследование молекулярного модуля кацийкальмодулин зависящая протеинкиназа - фосфопроteinфосфатаза. В сб. тез. "Актуальные проблемы нейробиологии". 26-28 октября 1999 г. Казань. С. 43.
  28. Платов К.В., Волченко А.М., Давыдов Д.А., Котов Н.В. Зависимость характеристик процессов в биомолекулярных системах от температуры. В сб. научн. работ "Физика в биологии и медицине" 2-4 марта 1999 г. Екатеринбург. С. 47-48.
  29. Волченко А.М., Давыдов Д.А., Платов К.В., Котов Н.В. Анализ биомолекулярных структур, управляющих активностью клеток эукариот. В сб. тез. II Съезд биофизиков России. 1999, Т. II. С. 422.
  30. Давыдов Д.А., Платов К.В., Котов Н.В. Киназа фосфорилазы: математическое моделирование // Биофизика. -2000. -Т. 45. Вып. 1. -С. 11-19.
  31. Давыдов Д.А., Платов К.В., Котов Н.В. Моделирование системы управляющей концентрацией  $Ca^{2+}$  в ресничках *Paramecium*. В сб. тез. "Четвертой международной конференции по математическому моделированию". Москва. 2000. -С. 39.
  32. Давыдов Д.А., Валеев Н.Е., Платов К.В., Ахмадеева А.К., Котов Н.В. Моделирование динамики возбудимой мембраны с кальций управляемыми кальциевыми каналами в условиях фиксации потенциала. В сб. тез. "Структура и динамика молекулярных систем". Йошкар-Ола - Казань - Москва. Изд-во МарГТУ. -2000. -С. 47.
  33. Котов Н.В., Волченко А.М., Давыдов Д.А., Костылева Е.К., Садыков И.Х., Платов К.В. Двигательная активность парамеций // Биофизика. -2000. -Т. 45. Вып. 3. -С. 514-519.
  34. Давыдов Д.А., Валеев Н.Е., Платов К.В., Ахмадеева А.К., Котов Н.В. Моделирование

- динамики возбудимой мембраны с кальций управляемыми кальциевыми каналами в условиях фиксации потенциала. В сб. статей "Структура и динамика молекулярных систем". М., -2000. -С. 182-185.
35. Давыдов Д.А., Платов К.В., Котов Н.В. Моделирование кальций управляемого кальциевого канала. В сб. тез. "Горизонты физико-химической биологии". Том 2. Пущино. 2000. С. 21.
36. Валеев Н.В., Давыдов Д.А., Платов К.В., Скоринкин А.И., Котов Н.В. Моделирование зависимости активности белка синапсина 1 от концентрации кальция. В сб. статей "Структура и динамика молекулярных систем". М., 2000. С. 213-216.
37. Давыдов Д.А., Платов К.В., Котов Н.В. Компьютерное моделирование при анализе сложных биомолекулярных систем. В мат. конференции "Компьютерное и математическое моделирование в естественных и технических науках", Тамбов, ТГУ, 2001. Вып. 1. С. 3-10.
38. Давыдов Д.А., Платов К.В., Котов Н.В. Биомолекулярная система, управляющая движением парameций на начальных этапах конъюгации. В сб. статей "Структура и динамика молекулярных систем". Йошкар-Ола., -2001. -С. 235-238.
39. Котов Н.В., Давыдов Д.А., Платов К.В. Молекулярные механизмы возбудимости одноклеточных. В сб. тез. XVIII съезда физиологического общества имени И.П. Павлова. Казань.-2001.- С. 128-129.